

Retensi Kalsium dan Fosfor Tikus Panhisterektomi yang Diberi Pakan Kalsium Tinggi

Calcium and Phosphor Retention in The Panhisterectomized Rats Fed High Calcium

Hartiningsih¹, Irkham Widiyono², Devita Anggraeni¹

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

²Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

Abstract

The objectives of the research was to study the effect of panhisterectomy on calcium (Ca) and phosphor (P) retention in the female Sprague Dawley rats that were fed *teri* which ratio of Ca:P is 3:1 for 12 weeks. Ten female of Sprague Dawley rats, 6 weeks of age were randomly divided into two groups (control and panhisterectomized groups) of five each. At 8 weeks of age, the rats of panhisterectomized group were panhisterectomized. At 20 weeks of age, they were placed into individual metabolic cages for balance study. The remaining of feed was collected for calcium and phosphor analyses. Every morning, from days 4 to 8 of the balance study, urine and fecal samples were also collected at the same time. The research results showed that calcium and phosphor retentions were significantly reduced ($P<0.05$) in panhisterectomized group compared to that of the control group. Fecal calcium excretion was a significantly higher ($P<0.05$), whereas fecal and urinary phosphor excretions were significantly higher ($P<0.05$) in the panhisterectomized group compared to that of the control group. It is concluded that panhisterectomy leads to a reduction of the calcium and phosphor retention in the Sprague Dawley rats that were fed high calcium.

Keywords : panhisterectomized, calcium, phosphor retention, individual metbolic cages, Sprague Dawley rats

Abstrak

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji pengaruh panhisterektomi terhadap retensi kalsium (Ca) dan fosfor (P) tikus putih *Sprague Dawley* yang diberi pakan ikan teri dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu. Sepuluh tikus putih betina *Sprague Dawley* umur 6 minggu secara acak dibagi 2 kelompok (kontrol dan panhisterektomi) masing-masing 5 tikus. Tikus kelompok panhisterektomi dilakukan panhisterektomi pada waktu umur 8 minggu. Pada umur 20 minggu tikus dipindah dalam kandang metabolik individu untuk studi balan. Pada hari ke 4-8 masa studi balan, setiap pagi dilakukan koleksi sisa pakan, feses dan urin untuk pemeriksaan kalsium dan fosfor. Hasil penelitian menunjukkan penurunan retensi kalsium dan fosfor tikus panhisterektomi yang berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan tikus kontrol. Peningkatan ekskresi kalsium dalam feses dan urin tikus panhisterektomi yang berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan tikus kontrol. Dari hasil penelitian ini disimpulkan, bahwa panhisterektomi menurunkan retensi kalsium dan fosfor tikus putih *Sprague Dawley* yang diberi pakan kalsium tinggi.

Kata kunci : panhisterektomi, retensi kalsium, fosfor, kandang metabolik individu, tikus putih Sprague Dawley

Pendahuluan

Retensi Ca dan P positif berperan penting dalam mempertahankan dan mencegah demineralisasi tulang maupun densitas tulang. Turunnya hormon estrogen pada masa menopause sering dikaitkan dengan meningkatnya resorpsi tulang, turunnya densitas tulang (Stone dkk, 1998; Slemenda dkk, 1996; Rae dkk, 1991) dan resiko tinggi terjadinya fraktur. Menurut beberapa peneliti, estrogen selain berperan dalam absorpsi Ca dan P melalui usus (Xu dkk, 2003; Colin dkk, 1999), juga berperan dalam reabsorpsi Ca dalam tubulus ginjal (Van Abel, 2002), menurunkan regulasi kotransporter NaPi ginjal dan meningkatkan ekskresi P dalam urin (Faroqui dkk, 2008; Dick dkk, 2004; Dick dan Prince, 2001). Sementara asupan Ca tinggi dapat meningkatkan pengendapan Ca dalam tulang, menurunkan hilangnya massa tulang dan menurunkan risiko fraktur tulang individu lanjut usia (Heaney, 2000). Penelitian pada tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang diberi pakan kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu mendukung mineralisasi tulang yang ditandai retensi Ca dan P positif meskipun terjadi peningkatan ekskresi Ca dan P dalam feses (Hartiningsih dkk, 2010). Ikan teri juga dapat digunakan sebagai bahan pangan alternatif untuk mencukupi kebutuhan protein dan mineral, karena mempunyai kandungan protein dan mineral tinggi dengan rasio Ca:P yang baik. Hartiningsih dkk, (2004) melaporkan bahwa tikus *Sprague Dawley* yang diberi pakan teri tawar dengan rasio Ca:P=0,5:0,7 (50:70 mg/100 g pakan) selama 4 minggu pasca panhisterektomi menyebabkan retensi Ca dan P positif. Namun pemanfaatan ikan teri

dengan rasio Ca relatif tinggi Ca:P=3:1 (90:30 mg/100g pakan) terhadap retensi Ca dan P individu pasca panhisterektomi belum pernah dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji retensi Ca dan P (konsumsi Ca dan P, ekskresi Ca dan P dalam feses dan urin) pada tikus panhisterektomi yang diberi pakan ikan teri dengan rasio Ca: P relatif tinggi selama 12 minggu sehingga dapat diperoleh informasi tentang manfaat dan keamanan ikan teri dalam pencegahan demineralisasi tulang.

Metode Penelitian

Sepuluh ekor tikus putih *Sprague Dawley* betina umur 4 minggu dimasukkan dalam kandang individu dengan suhu ruang berkisar 27-28°C. Pada umur 6 minggu, tikus secara acak dibagi 2 kelompok (kontrol dan panhisterektomi atau perlakuan) masing-masing 5 tikus. Setiap tikus diberi pakan standar (mengandung protein 20%, Ca 0,5% dan P 0,7%) dan air minum aquabidestilata secara *ad libitum*. Pada waktu tikus berumur 8 minggu, tikus kelompok panhisterektomi dilakukan operasi panhisterektomi (operasi pengambilan uterus dan ovarium). Pada umur 9 minggu, seluruh tikus diberi pakan yang mengandung kalsium tinggi (0,9% Ca dan 0,3% P atau 90 mg Ca/100 g pakan : 30 mg P/100 g pakan atau Ca:P=3:1). Komposisi pakan (% atau g/100 g pakan) yang diberikan terdiri dari 78% jagung, 17% teri tawar, 2,3% molase, 1,3% CaCO₃, 0,5% NaH₂PO₄, dan 0,9% vitamin mineral.

Studi balan dilakukan pada waktu tikus umur 20 minggu. Selama studi balan, setiap tikus ditempatkan dalam kandang metabolik individu, diberi pakan 15 gram/hari dan minum

aquabidestilata 120 ml/hari. Pada hari ke 4-8 masa studi balan, setiap pagi dilakukan koleksi feses, urin, sisa pakan dan sisa air minum. Urin yang terkumpul, setelah diukur volumenya dan ditambahkan larutan HCl 37% sehingga mempunyai pH 1, disimpan dalam suhu -5°C . Feses dan sisa pakan yang dikumpulkan, setelah dikeringkan dan ditimbang juga disimpan dalam suhu -5°C . Untuk pemeriksaan Ca dan P dalam pakan dan feses, 3 gram sampel feses dan 6 gram sampel pakan diabukan pada suhu 600°C sesuai metode Harris (1970). Pemeriksaan Ca dan P urin dilakukan setelah 3 ml sampel urin dipersiapkan dengan cara penguapan pada suhu 60°C , pelarutan dengan HCl 37% dan pengenceran sesuai metoda Harris (1970). Kalsium pakan, feses dan urin diperiksa dengan alat *automatic chemistry Beckman Counter synchron Cx9 Pro.*, metoda *Arsenazo III*. Pemeriksaan Ca dalam pakan dan feses dilakukan dengan metode yang sama, setelah pakan dan feses ditentukan kadar

airnya, diabukan pada suhu 600°C sesuai dengan metode yang diterangkan oleh Harris (1970). Pemeriksaan P dalam pakan, feses dan urin dilakukan dengan AAS (Atomic adsorbensia Spectrometry). Data hasil pemeriksaan Ca dan P dianalisis dengan uji t.

Kalsium dan P pakan yang dikonsumsi, retensi Ca dan P, ekskresi Ca dan P dalam feses dan urin dihitung berdasar metode Nordin dkk, (1976), Toromanoff dkk, (1997) dan Scholz-Ahrens *et al.* (2007).

Hasil dan Pembahasan

Konsumsi Ca tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi tidak berbeda signifikan dengan tikus kontrol meskipun lebih tinggi, namun ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan dengan tikus kontrol (Tabel 1).

Tabel 1. Rerata konsumsi, retensi, ekskresi Ca dalam feses dan urin (mg/hari) tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi pakan kalsium tinggi selama 12 minggu pasca panhisterektomi

Parameter	Panhisterektomi	Kontrol	Signifikansi
Konsumsi Ca (mg/hari)	98,88±20,60	86,97±18,12	ns
Retensi Ca (mg/hari)	71,58±14,60	78,52±17,70	*
Ca feses (mg/hari)	25,23± 5,54	6,23±1,54	**
Ca urin (mg/hari)	2,07±0,82	2,17±2,45	ns

Keterangan :

ns = Nonsignifikan

* Berbeda signifikan (P<0,05)

** Berbeda sangat signifikan (P<0,01)

Hal yang sama terjadi pada tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu pasca panhisterektomi (Hartiningsih dkk, 2010). Dilaporkan Scholz-Ahrens dkk, (2007) bahwa nilai absorpsi mineral (Ca dan P) adalah selisih dari jumlah mineral (Ca dan P) yang dikonsumsi dengan jumlah mineral (Ca dan P) yang diekskresikan dalam feses. Dalam penelitian ini lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses dengan demikian menunjukkan penurunan absorpsi Ca usus. Beberapa peneliti melaporkan bahwa rendahnya kadar estrogen menurunkan absorpsi Ca usus individu pasca menopause (Holzherr dkk, 2000; Van den Hauvel dkk, 2000), maupun tikus pasca ovariektomi (O'Loughlin dan Morris, 2003; Watanabe dkk, 2001; Kalu and Orchii, 1999). Sementara peneliti lain membuktikan bahwa terapi dengan estrogen meningkatkan absorpsi Ca usus halus tikus ovariektomi (Colin dkk, 1999; Kalu and Orchii, 1999; O'Loughlin and Morris, 1998), dan perempuan pasca menopause (Bolscher dkk, 1999). Menurut Chen dan Kalu (1998) estrogen berperan langsung dalam absorpsi Ca usus secara transpot aktif melalui reseptor estrogen yang terdapat pada sel mukosa usus halus. Dalam penelitian ini, turunnya absorpsi Ca usus tikus panhisterektomi yang ditandai lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses kemungkinan disebabkan turunnya estrogen. Namun, dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap hormon estrogen.

Ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi tidak berbeda signifikan dengan tikus kontrol meskipun lebih rendah (Tabel 1). Hal yang sama terjadi pada tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu (Hartiningsih dkk, 2010). Hasil

penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan O'Loughlin dan Morris (1998) bahwa ovariektomi pada tikus *Sprague Dawley* umur 7 bulan (10 minggu pasca ovariektomi) meningkatkan ekskresi Ca dalam urin. Hal yang sama dilaporkan Morris dkk, (1995), O'Loughlin dan Morris (2003), dan Draper dkk, (1999). Ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi yang tidak berbeda signifikan dengan tikus kontrol menunjukkan terjadinya peningkatan reabsorpsi Ca oleh ginjal, yang kemungkinan sebagai kompensasi terhadap lebih rendahnya absorpsi Ca usus yang ditandai lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi ($\pm 25\%$ dari jumlah Ca yang dikonsumsi). Dilaporkan oleh Panda dkk, (2004), Kerstetter dkk, (2003), dan Tordoff dkk, (1998) bahwa turunnya absorpsi Ca usus dan turunnya Ca darah meningkatkan hormon paratiroid. Menurut Mihai dan Fardon (2000) untuk mempertahankan Ca darah dalam kisaran normal, sistem homeostasis Ca terutama hormon paratiroid antara lain beraksi pada ginjal untuk meningkatkan reabsorpsi Ca yang ditandai turunnya ekskresi Ca melalui urin, dan menurunkan absorpsi P yang ditandai lebih tingginya ekskresi P melalui urin. Dalam penelitian ini, jumlah P yang diekskresikan dalam urin tikus panhisterektomi juga lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan dengan tikus kontrol (Tabel 2). Hal tersebut menggambarkan terjadinya penurunan reabsorpsi P oleh ginjal yang ditandai dengan meningkatnya P dalam urin atau fosforuria. Lebih rendahnya ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi meskipun tidak berbeda signifikan dengan tikus kontrol, dan lebih tingginya P yang diekskresikan dalam urin tikus panhisterektomi yang berbeda sangat signifikan dengan tikus kontrol,

menunjukkan keterlibatan hormon paratiroid sebagai regulator utama homeostasis Ca (Need dkk, 2000). Namun, dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap hormon paratiroid. Dilaporkan Riccardi dkk, (1998) bahwa Ca mengatur transpot P yang tergantung hormon paratiroid melalui aktivasi *Ca sensing reseptor* yang diekspresikan pada membran apek dan basolateral tubulus proksimal ginjal. Ba dkk, (2003) juga melaporkan bahwa pemacuan terhadap reseptor hormon paratiroid tipe I yang diekspresikan dalam membran apeks dan membran basolateral tubulus proksimal ginjal dapat menghambat absorpsi P dalam tubulus proksimal ginjal.

Lebih rendahnya retensi Ca tikus panhisterektomi yang berbeda signifikan dengan tikus kontrol (Tabel 1) diduga disebabkan lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses ($\pm 25\%$ dari konsumsi Ca) tikus panhisterektomi yang berbeda sangat signifikan dengan tikus kontrol ($\pm 7\%$). Dalam penelitian ini, rasio antara Ca yang

diekskresikan dalam feses dengan yang diekskresikan dalam urin tikus kontrol 3:1. Sementara rasio antara Ca yang diekskresikan dalam feses dengan yang diekskresikan dalam urin tikus panhisterektomi 12:1. Hasil yang sama terjadi pada tikus normal yang mengkonsumsi kasein (O'Loughlin dan Morris, 2003), dan kedelai (Hartiningsih dkk, 2008). Penelitian pada tikus panhisterektomi yang dilakukan (Hartiningsih dkk, 2008) dan Morris dkk, (1995) juga menunjukkan peningkatan rasio ekskresi Ca dalam feses terhadap ekskresi Ca dalam urin (Ca feses : Ca urin = 10-11:1).

Ekskresi P dalam feses tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi lebih tinggi dan berbeda signifikan dengan tikus kontrol (Tabel 2). Hal yang sama terjadi pada tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu (Hartiningsih dkk, 2010). Beberapa peneliti melaporkan bahwa diet rendah P secara cepat menurunkan P dalam plasma, memacu sintesis vitamin D

Tabel 2. Rerata konsumsi, retensi, ekskresi fosfor (P) dalam feses dan urin (mg/hari) tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi pakan kalsium tinggi selama 12 minggu pasca panhisterektomi

Parameter	Panhisterektomi	Kontrol	Signifikansi
Konsumsi P (mg/hari)	37,71 \pm 7,85	33,17 \pm 6,91	ns
Retensi P (mg/hari)	23,94 \pm 3,45	28,25 \pm 3,65	*
P feses (mg/hari)	2,88 \pm 0,88	1,2 \pm 0,83	*
P urin (mg/hari)	10,90 \pm 4,90	3,72 \pm 3,29	*

Keterangan :

ns = Nonsignifikan

* Berbeda signifikan (P<0,05)

(Portal dkk, 1989; Tenenhouse dan Martel, 1993), dan memicu peningkatan absorpsi P dalam usus secara aktif (Cross dkk, 1990). Menurut Portal dkk, (1989) konsumsi pakan rendah P meningkatkan aktivitas kotransporter pompa NaPi-IIb usus. Beberapa peneliti melaporkan bahwa absorpsi P dalam usus melalui transpot aktif dengan media *kotransporter sodium-fosfat* (NaPi-IIb) diatur oleh diet rendah P dan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Hattenhauer dkk, 1999; Xu dkk, 2002), hormon paratiroid (Kempson dkk, 1995), dan estrogen (Pike dkk, 1978). Dinyatakan Gennary dkk, (1990) bahwa estrogen berperan meningkatkan aktivitas enzim $1,25$ -hidroksilase dalam ginjal yang berperan sebagai katalisator produksi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Estrogen juga berperan meningkatkan ekspresi reseptor vitamin D (VDR) dalam mukosa usus (Liel dkk, 1999). Dilaporkan Segawa dkk, (2004) bahwa aktivitas membran *brush-border* usus dan kotransporter pompa NaPi-IIb secara signifikan menurun pada mencit negatif VDR. Dari temuan di atas memberi gambaran bahwa turunnya absorpsi P dalam usus yang ditandai lebih tingginya ekskresi P dalam feses tikus panhisterektomi menunjukkan adanya keterkaitan dengan kemungkinan turunnya estrogen. Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa panhisterektomi berpengaruh meningkatkan ekskresi P dalam feses tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi ikan teri dengan rasio Ca:P= 90:30 mg/100 g pakan atau Ca:P=3:1 selama 12 minggu.

Tikus panhisterektomi mempunyai nilai retensi P lebih rendah dan berbeda signifikan dengan retensi P tikus kontrol (Tabel 2). Lebih tingginya ekskresi P dalam urin ($\pm 28\%$ dari konsumsi P) tampaknya menjadi faktor penyebab lebih rendahnya nilai retensi tikus panhisterektomi, meskipun ekskresi P

dalam feses tikus panhisterektomi juga lebih tinggi dibanding tikus kontrol (Tabel 2). Dalam penelitian ini, rasio antara ekskresi P dalam urin dengan ekskresi P dalam feses tikus kontrol 2,5:1 (P urin:P feses=2,5:1), sementara tikus panhisterektomi 3,5:1. Hartiningsih dkk, (2008) juga melaporkan bahwa lebih tingginya ekskresi P dalam urin tikus panhisterektomi yang mengkonsumsi pakan kedelai dengan rasio Ca:P=1:1 selama 4 minggu menjadi faktor penentu lebih rendahnya retensi P. Dilaporkan Hartiningsih dkk, (2010) bahwa tidak berbedanya ekskresi P dalam urin antara tikus panhisterektomi dengan tikus kontrol yang mengkonsumsi pakan kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu menjadi penyebab tidak berbedanya retensi P kedua kelompok tikus tersebut.

Hasil studi balan menunjukkan bahwa tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang mengkonsumsi ikan teri dengan rasio Ca:P= 90:30 mg/100 g pakan atau Ca:P=3:1 selama 12 minggu tetap mempunyai nilai retensi Ca dan P positif. Dalam penelitian ini retensi mineral (Ca dan P) analog dengan balan mineral (Ca dan P). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Scholz-Ahrens dkk, (2007) bahwa retensi mineral (Ca dan P) adalah selisih dari jumlah mineral (Ca dan P) yang dikonsumsi dengan jumlah mineral (Ca dan P) yang diekskresikan dalam feses dan urin. Sementara menurut Toromanoff dkk, (1997) balan mineral diartikan sebagai selisih dari jumlah mineral yang dikonsumsi dengan jumlah mineral yang diekskresikan dalam feses dan urin. Dilaporkan oleh O'Loughlin dan Morris (1994) bahwa ada keterkaitan antara balan atau retensi Ca dengan akumulasi atau pengendapan mineral dalam tulang. Retensi Ca dan P positif dengan demikian menunjukkan terjadinya akumulasi atau

pengendapan Ca dan P dalam tulang. Dalam penelitian ini, lebih rendahnya retensi Ca dan P tikus panhisterektomi menggambarkan lebih rendahnya pengendapan mineral Ca dan P dalam tulang tikus panhisterektomi.

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa panhisterektomi pada tikus *Sprague Dawley* yang diberi pakan kalsium tinggi (Ca:P= 90:30 mg/100 g pakan atau Ca:P=3:1) selama 12 minggu menurunkan retensi Ca dan P.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan sebagian dari hasil penelitian yang dibiayai dari anggaran dana masyarakat Universitas Gadjah Mada. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada yang telah memberi dana penelitian sesuai surat perjanjian pelaksanaan penelitian nomor 2323b/P.II/Set.R./2004.

Daftar Pustaka

- Ba, J., Dennis, B. and Friedman, P.A., (2003) Calcium-sensing receptor regulation of PTH-Inhibitable proximal tubule phosphate transport. *Am. J. Physiol.* 285: F1233-F1243.
- Bolscher, M.T., Netelenbos, J.C., Barto, R., Van Buuren, L.M. and Van Der Vijgh, W.J.F. (1999) Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact ovariectomized adult rat. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1197–1202.
- Colin, E.M., Van Den Bemd, G.J., Van Aken, M., Christakors, S., De Jonge, H.R., Deluca, H.F., Prah, J.M., Birkenhager, J.C., Buurman, C.J., Pols, H.A. and Van Leeuwen, J.P., (1999) Evidence for involvement of 17 β -estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ level in the rat. *J. Bone Miner. Res.* 14: 57-64.
- Chen, C. and Kalu, D.N., (1998) Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *J.P.E.T.* 286: 328-333.
- Cross, H.S., Debiec, H. and Peterlik, M. (1990) Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner. Electrolyte Metab.* 16: 115-124.
- Dick, I.M. and Prince, R.L. (2001) The effect of estrogen on renal phosphorus handling in the rat. *Am. J. Nephrol.* 21: 323-330.
- Dick, I.M., Devine, A., Beilby, J. and Prince, R.L. (2004) Effect of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *Am. J. physiol. Endocrinol Metab.* 288: E430-E435.
- Draper, C.R, Dick, D.I. and Prince, R.L. (1999) The effect of estrogen deficiency on calcium balance in mature rats. *Calcif. Tissue Int.* 64: 325-328.
- Faroqui, S., Levi, M., Soleimani, M. and Amal, H. (2008) Estrogen downregulates the proximal tubule type IIa sodium phosphate cotransporter causing phosphate wasting and hypophosphatemia. *Kidney Int.* 73: 1141-1150.
- Gennari, C., Agnusdei, D., Nardi, P. and Civitelli, R. (1990) Estrogen preserve a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D, in oophorectomized woman. *Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 1288-1293.
- Harris, L.E. (1970) Nutrition research techniques for domestic and wild animals, Vol. Animal Science Dept. Utah State Univ., Logan, Utah. pp. 2651.
- Hartiningih, Widiyono I dan Anggraeni D. (2004) Respon tulang dan ginjal tikus penderita osteopati terhadap konsumsi ikan teri tawar atau kedelai : studi penanggulangan osteodistrofia fibrosa. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada.

- Hartiningsih, Irwanto, A., Sari, R.A. dan Anggraeni D. (2008) Pengaruh panhisterektomi terhadap retensi kalsium dan fosfor *Sprague Dawley* yang diberi pakan kedelai selama empat minggu. *J. Sain Vet.* 26: 88-95.
- Hartiningsih, Anggraeni D., Mulyono, S. dan Ismaryanto, S. (2010) Pengaruh panhisterektomi terhadap retensi kalsium dan fosfor *Sprague Dawley* yang diberi pakan kedelai selama 12 minggu. *J. Sain Vet.* 28: 9-26.
- Hattenhauer, O., Traebert, M., Heini Murer, H. and Biber, J. (1999) Regulation of small intestinal Na-P_i type IIb cotransporter by dietary phosphate intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277: G756-G762.
- Heaney, R.P. and Nordin, B.E.C. (2002) Calcium effects on phosphorus absorption : Implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *J. Am. Col. Nutr.* 21: 239-244.
- Holzherr, M.L., Retallack, R.W., Gutteridge, D.H., Price, R.I., Faulkner, D.I., Wilson, S.G., Will, R.K., Steward, G.O., Stuckey, B.G., Prince, R.L., Criddle, R.A., Kent, G.N., Bhagat, C.I., Dhaliwal, S.S. and Jamrozik, K. (2000) Calcium absorption in postmenopausal osteoporosis : benefit of HRT plus calcitriol, but not HRT alone, in both malabsorbers and normal absorbers. *Osteoporos. Int.* 11: 43-51.
- Kalu, D.N. and Chen, C. (1999) Ovariectomized murine model of postmenopausal calcium malabsorption. *J. Bone Miner. Res.* 14: 593-601.
- Kempson, S.A., Lotscher, M., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H. and Levi, M. (1995) Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 268: F784-791.
- Kerstetter, J. E., O'Brien, K.O. and Insogna, K.L. (2003) Low protein intake : The impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J. Nutr.* 133: 855S-861S.
- Liel, Y., Shany, S., Smirnoff, P. and Schwartz, B. (1999) Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and Bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinol.* 140: 280-285.
- Mihai, R. and Faradon, J.R. (2000) Parathyroid disease and calcium metabolism. *Britis J. Anaesthesia.* 85: 29-43.
- Morris, H.A., O'Loughlin, P.D., Mason, R.A. and Schulz, S.R. (1995) The effect of oophorectomy on calcium homeostasis. *Bone.* 17: 189S-174S.
- Need, A.G., Horowitz, M., Morris, H.A. and Nordin, B.E.C. (2000) Vitamin D status : effects on parathyroid hormone and 1,25-dihydroxy vitamin D in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1577-1581.
- Nordin, B.E.C., Horsman, A. and Aaron. J. (1976) Diagnostic procedures in Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism : Clinical physiology and Diagnostic Procedures, *ed.* Nordin, B.E.C. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 468-524.
- O'Loughlin, P.D. and Morris, H.A. (2003) Oophorectomy acutely increasing calcium excretion in adult rat. *J. Nutr.* 133: 2277-2280.
- O'Loughlin, P.D. and Morris, H.A. (1998) Estrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in rat. *J. Physiol.* 511: 313-322.
- O'Loughlin, P.D. and Morris, H.A. (1994) Oophorectomy in the young rat impairs calcium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J. Nutr.* 124: 726-731.
- Panda, D.K., Miao, D., Bolivar, I., Li, J., Huo, R., Hendy, G.E. and Goltzman, D. (2004) Inactivation of 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J. Biol. Chem.* 16: 16754-16766.
- Pike, J.W., Spanos, E., Colston, K.W., MacIntyre I. and Haussler, M.R. (1978) Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1 α ,25-(OH)₂D₃ in chicks. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 235: E338-E343.
- Portal, A.A., Halloran, B.P. and Curtis, R. (1989) Physiological regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorous in normal men. *J. Clin. Invest.* 83: 1494-1499.

- Rae, M.H., Mole, P.A. and Paterson, C.R. (1991) Endogenous factors affecting bone mineral content in post-menopausal women. *Maturitas*. 13: 319-324.
- Riccardi, D., Hall, A.E., Chattopadhyay, N., Xu, J.Z., Brown, E.M. and Hebert, S.C. (1998) Localization of the extracellular Ca²⁺ polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 274: F611-F622.
- Scholz-Ahrens, K.E., Deling, G., Stampa, B., Helfenstein, A., Hahne, H.J., Acil, Y., Timm, W., Barkmann, R., Hassenpflug, J., Schrezenmeir, J. and Gluer, C.C. (2007) Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Gottingen miniature pigs: effects on bone mineral and mineral metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: E385-E395.
- Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahata, M., Inoue, Y., Kato, S., Miyamoto and Ken-ichi. (2004) Intestinal Na-P_i cotransporter adaptation to dietary P_i content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287: F39-F47.
- Slemenda, C., Longcope, C., Peacock, M., Hui, S. and Johnston, C.C. (1996) Sex steroids, bone mass, and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *J. Clin. Invest.* 97: 14-21.
- Stone, K., Bauer, D.C., Black, D.M., Sklarin, P., Ensrud, K.E. and Cumming, S.R. (1998) Hormonal predictors of bone loss in elderly women: a prospective study. The study of osteoporotic fractures research group. *J. Bone Miner. Res.* 13: 1167-1174.
- Tenenhouse, H. S., and Martel, J. (1993) Renal adaptation to phosphate deprivation: lessons from the X-linked *Hyp* mouse. *Pediatr. Nephrol.* 7: 312-318.
- Tordoff, M.G., Hughes, R.L. and Pilchak, D.M. (1998) calcium intake by rats: influence of parathyroid hormone, calcitonin, and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R214-R231.
- Toromanoff, A., Ammann, P., Mosekilde, L., Thomsen, J.S. and Riond, J. (1997) Parathyroid hormone increases bone formation and improve mineral balance in vitamin D-deficient female rats. *Endocrinology*. 138: 2449-2457.
- Van Abel, M., Hoenderop, J.G.J., Dardenne, O., St. Arnaud, R., Van Os, C.H., Van Leeuwen, H.J.P.T.M. and Bindels, R.J.M. (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J. Am. Nephrol.* 13: 2102-2109.
- Van den Heuvel, E.G., Schoterman, M.H. and Muijs, T. (2000) Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J. Nutr.* 130: 2938-2942.
- Watanabe, O., Hara H., Ayoma Y. and Kasai T. (2001) Improving effect of feeding with a phosphorylated guar gum hydrllysate on calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 613-618.
- Wood, R.J. (2000) Searching for determinants of intestinal calcium absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 675-676.
- Xu, H., Uno, J.K., Inouye, M., Xu, L., Drees, J.B., Collin, J.F. and Ghishan, F.K. (2003) Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am. J. Physiol. Gastrointest.* 285: G1317-G1324.
- Xu, H., Bai, L., Collin, J.F. and Ghishan, F.K. (2002) Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Am. J. Physiol.* 282: C487-C493.