

**PENGARUH PANHISTEREKTOMI TERHADAP RETENSI KALSIMUM DAN FOSFOR  
TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIBERI PAKAN KEDELAI SELAMA 12 MINGGU**

THE EFFECT OF PANHISTERECTOMIZED ON CALCIUM AND PHOSPHOR RETENTION  
*SPRAGUE DAWLEY* RATS FED SOYBEAN FOR 12 WEEKS

Hartiningsih<sup>1</sup>, Devita Anggraini<sup>1</sup>, Slamet Mulyono<sup>2</sup>, Adik Ismaryanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Yogyakarta

<sup>2</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta  
E-mail: hartiningsih56@yahoo.com

**ABSTRACT**

The objectives of the study were to study the calcium (Ca) and phosphor (P) retention in panhisterectomized *Sprague Dawley* rats that were fed soybean whose 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 group) of five each. At 8 weeks of age, the rats of panhisterectomized group were panhisterectomized. At 20 weeks of age, they were placed in individual metabolic cages for balance study. Every morning, from day 4 to 8 of the balance study, the remaining of feed was collected for Ca and P analyses. Urine and fecal samples were also collected at the same time. The results showed that Ca and P retention were significantly reduced ( $P < 0.01$ ) in panhisterectomized group compared to the control group. Fecal Ca and P excretion were significantly higher ( $P < 0.01$ ), while urinary Ca and P excretion were not significantly different in both groups. From the results it could be concluded that panhisterectomy in rats consuming soybean whose ratio of Ca:P is 3:1 for 12 weeks causes a reduction in Ca and P retention panhisterectomy and an increase in fecal Ca and P excretion.

**Key words:** panhisterectomized, calcium and phosphor retention

**ABSTRAK**

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji retensi kalsium (Ca) dan fosfor (P) tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang diberi pakan kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu. Sepuluh tikus 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 Ca dan P. Hasil penelitian menunjukkan retensi Ca tikus panhisterektomi lebih rendah dan berbeda sangat signifikan ( $P < 0,01$ ), retensi P tikus panhisterektomi lebih rendah dan berbeda signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan tikus kontrol, ekskresi Ca dan P dalam feses tikus panhisterektomi lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan ( $P < 0,01$ ) dengan tikus kontrol. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa panhisterektomi pada tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu menurunkan retensi Ca dan P, meningkatkan ekskresi Ca dan P dalam feses.

**Kata kunci :** panhisterektomi, retensi kalsium dan fosfor

## PENDAHULUAN

Osteoporosis atau rapuh tulang merupakan salah satu penyakit degeneratif tulang yang terjadi akibat lebih tingginya resorpsi tulang dibanding dengan pembentukan tulang. Tulang yang mengalami osteoporotik mempunyai densitas rendah sehingga beresiko tinggi terhadap terjadinya fraktur (Nguyen dan Eisman, 2000). Turunnya hormon estrogen dapat menjadi penyebab turunnya absorpsi Ca dan P dalam intestinal (Xu dkk., 2003), meningkatnya ekskresi Ca urin (Dick dkk., 2004) dan turunnya ekskresi P urin (Dick dan Prince, 2001; Dick dkk., 2004), balan Ca dan P negatif, serta hilangnya massa tulang (Young dkk., 1968). Berbagai penelitian untuk menghambat turunnya densitas tulang dan hilangnya massa tulang individu usia lanjut dengan memanfaatkan kedelai sebagai terapi sulih hormon estrogen sudah banyak dilakukan. Tsuang dkk. (2008) melaporkan lebih tingginya massa tulang tikus *Wistar* yang mengkonsumsi kedelai (fitoestrogen) selama 1 bulan sebelum dan selama 2 bulan pasca ovariektomi. Sementara Hartiningsih dkk. (2004) melaporkan bahwa tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang diberi pakan kedelai dengan rasio Ca:P = 1:1 selama 4 minggu meningkatkan ekskresi Ca dalam feses, meningkatkan ekskresi P dalam urin dan mempunyai retensi Ca dan P lebih rendah. Menurut Neer dkk. (2001) dan Dure dkk. (1996) untuk meningkatkan densitas mineral tulang individu pasca menopause, diperlukan Ca dosis tinggi. Namun Heaney dan Nordin (2002) melaporkan bahwa penggunaan suplemen Ca sehingga rasio Ca terhadap P menjadi lebih tinggi menurunkan absorpsi P intestinal. Oleh karena itu

penelitian ini dimaksudkan untuk mengkaji pengaruh panhisterektomi terhadap retensi Ca dan P (konsumsi Ca dan P, ekskresi Ca dan P dalam feses dan urin) tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai mengandung Ca relatif tinggi dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu. Hasil penelitian ini selain diharapkan dapat bermanfaat untuk mencegah demineralisasi tulang juga dapat diperoleh informasi tentang pemanfaatan konsumsi kedelai dan Ca tinggi (Ca:P=3:1) tanpa ada komplikasi pada organ tubuh seperti ginjal apabila dikonsumsi dalam waktu lama.

## MATERI DAN METODE

Sepuluh tikus *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). Ketika umur 9 minggu, tikus diberi pakan yang mengandung 0,9% Ca dan 0,3% P atau Ca:P=3:1 (90 mg Ca/100 gram pakan : 30 mg P/100 gram pakan). Komposisi pakan (% atau gram/100 gram pakan) yang diberikan berasal dari 55% tepung jagung, 40% tepung kedelai, 1,6% molase, 2,5% CaCO<sub>3</sub>, 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 metoda o-kresophthelein-komplekson (Ray Sarker dan Chaunan, 1967). 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 Scholz-Ahrens *dkk.* (2007).

Konsumsi Ca (mg/hari) = Rata-rata konsumsi pakan setiap hari x Ca dalam pakan

Retensi Ca (mg/hari) = konsumsi Ca - (Ca feses + Ca urin)

Konsumsi P (mg/hari) = Rata-rata konsumsi pakan setiap hari x P dalam pakan

Retensi P (mg/hari) = konsumsi P - (P feses + P urin)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsumsi Ca tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi tidak berbeda dengan tikus kontrol, namun ekskresi Ca dalam feses lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan ( $P < 0,01$ ) dengan tikus kontrol (Tabel 1). 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.

Tabel 1. Rerata konsumsi, retensi, ekskresi Ca dalam feses dan urin (mg/hari) tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu pasca panhisterektomi

Parameter	panhisterektomi	kontrol	signifikansi
Konsumsi Ca mg/hari/Kg BB	416,51±59,12	440,51±49,74	ns
Retensi Ca mg/hari/Kg BB	265,45±37,84	379,84±49,98	**
Ekskresi Ca feses mg/hari/Kg BB	140,17±24,98	46,76±6,88	**
Ekskresi Ca urin mg/hari/Kg BB	10,90±3,48	13,74±8,55	ns

Keterangan :

ns = nonsignifikan; \*\* berbeda sangat signifikan ( $P < 0,01$ )

Kg BB = Kilogram berat badan

Dalam penelitian ini lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses dengan demikian menunjukkan penurunan absorpsi Ca dalam intestinal. Hal yang sama terjadi pada tikus *Spragus Dawley* yang mengkonsumsi teri tawar dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu pasca panhisterektomi (Hartiningsih dkk., 2004). Nordin dkk. (2004) juga melaporkan terjadinya penurunan absorpsi Ca intestinal meskipun tidak ada penurunan kadar 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub> serum, hal tersebut merefleksikan hilangnya aksi estrogen pada intestinal. Dari uraian tersebut menunjukkan bahwa turunnya absorpsi Ca dalam intestinal tikus panhisterektomi yang ditandai lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses kemungkinan disebabkan turunnya estrogen.

Beberapa peneliti melaporkan terjadinya penurunan absorpsi Ca intestinal akibat lebih rendahnya estrogen individu pasca menopause (Holzherr dkk., 2000; Van den Hauvel dkk., 2000) maupun tikus pasca ovariektomi (Watanabe dkk., 2001; Kalu dkk., 1999; O'Loughlin dan Morris, 2003). Sementara peneliti lain membuktikan bahwa terapi dengan estrogen meningkatkan absorpsi Ca intestinal tikus ovariektomi (O'Loughlin dan Morris, 1998; Kalu dkk., 1999) dan perempuan pasca menopause (Bolscher dkk., 1999). Menurut Chen dan Kalu (1998) estrogen berperan langsung dalam absorpsi Ca intestinal secara transpot aktif melalui reseptor estrogen yang terdapat pada sel mukosa intestinal. Ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi yang lebih tinggi memberi

gambaran adanya keterkaitan antara turunnya hormon estrogen dalam sirkulasi darah dengan turunnya absorpsi Ca intestinal tikus panhisterektomi.

Ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi tidak berbeda dengan tikus kontrol (Tabel 1). Hal yang sama terjadi pada tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi teri tawar dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu (Hartiningsih dkk., 2004). Ekskresi Ca dalam urin tikus panhisterektomi yang tidak berbeda dengan tikus kontrol menunjukkan bahwa perlakuan panhisterektomi pada tikus yang mengkonsumsi pakan kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu kemungkinan tidak memicu resorpsi tulang atau demineralisasi tulang meskipun terjadi peningkatan ekskresi Ca dalam feses. Dilaporkan Shirke dkk. (2008) bahwa tikus *Sprague Dawley* dewasa ovariektomi yang diberi pakan standar (*Standard rodent pellet*) selama 10 minggu meningkatkan ekskresi Ca dalam urin, meningkatkan aktivitas remodelling tulang (resorpsi dan pembentukan tulang) dalam hal ini resorpsi tulang lebih tinggi dibanding pembentukan tulang, terjadi peningkatan alkaline fosfatase dan tartrat resisten asam fosfatase, dan turunnya Ca dan P tulang. Nordin dkk. (2004) melaporkan turunnya reabsorpsi Ca ginjal yang ditandai oleh meningkatnya ekskresi Ca urin perempuan menopause. Dilaporkan juga bahwa turunnya absorpsi Ca intestinal dan turunnya reabsorpsi Ca ginjal merefleksikan turunnya aksi estrogen pada intestinal dan ginjal.



Tabel 2. Rerata konsumsi, retensi, ekskresi P dalam feses dan urin (mg/hari) tikus *Sprague Dawley* yang mengkonsumsi kedelai dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu pasca panhisterektomi

Parameter	panhisterektomi	kontrol	signifikansi
Konsumsi P mg/hari/Kg BB	146,54±20,80	154,92±17,50	ns
Retensi P mg/hari/Kg BB	98,07±15,92	119,84±6,10	*
Ekskresi P feses mg/hari/Kg BB	25,77±8,11	10,88±5,60	*
Ekskresi P urin mg/hari/Kg BB	22,70±3,56	25,58±1,11	ns

Keterangan :

ns = nonsignifikan; \* berbeda signifikan ( $P < 0,05$ );

Kg BB = Kilogram berat badan

Konsumsi P tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi juga tidak berbeda dengan tikus kontrol, namun ekskresi P dalam feses lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan ( $P < 0,01$ ) dengan tikus kontrol. Hal yang sama terjadi pada tikus *Sprague Dawley* panhisterektomi yang mengkonsumsi teri tawar dengan rasio Ca:P=3:1 selama 12 minggu (Hartiningsih dkk., 2004). Dilaporkan Brink dkk. (1992) bahwa asupan Ca tinggi menurunkan absorpsi P. Menurut Brink dkk. (1992) diet Ca tinggi menghambat absorpsi P intestinal akibat terbentuk kompleks kalsium fosfat yang tidak larut dalam lumen intestinal yang menyebabkan lebih rendahnya ketersediaan P. Beberapa peneliti melaporkan bahwa diet rendah P secara cepat menurunkan P dalam plasma, memacu sintesis vitamin D (Tenenhouse dan Martel, 1993), dan memacu peningkatan absorpsi P dalam intestinal secara aktif (Cross dkk., 1990). Menurut Radanovic dkk. (2004) konsumsi pakan rendah P meningkatkan aktivitas transpot P secara aktif atau secara transeluler yang ditandai dengan meningkatnya protein kotransporter pompa NaPi-IIb intestinal. Beberapa peneliti melaporkan bahwa absorpsi P dalam intestinal melalui transpot aktif dengan media *kotransporter sodium-fosfat*

(NaPi-IIb) diatur oleh diet rendah P (Hattenhauer dkk., 1999), dan estrogen (Pike dkk., 1978). Dinyatakan Xu (2003) bahwa estrogen berperan meningkatkan absorpsi P intestinal melalui aktivasi transkripsi gene NaPi-Iib. Dari temuan di atas memberi gambaran bahwa turunnya absorpsi P dalam intestinal yang ditandai lebih tingginya ekskresi P dalam feses tikus panhisterektomi kemungkinan disebabkan turunnya estrogen. Namun dalam penelitian ini tidak dilakukan terhadap hormon estrogen.

Ekskresi P melalui urin tikus panhisterektomi lebih rendah meskipun tidak berbeda dengan tikus kontrol (Tabel 2). Menurut Segawa dkk., (2004) diet P rendah selain memicu ekspresi protein kotransporter type Iib dalam enterosit juga memicu protein transporter type Iia dan Iic dalam sel ginjal mencit yang tidak mempunyai reseptor vitamin D. Rendahnya P dalam pakan memicu regulasi kotransporter type Iia ginjal untuk meningkatkan absorpsi Pi (Kido dkk., 1999; Lotscher dkk., 1996). Dick dan Prince (2001) melaporkan bahwa defisiensi estrogen menyebabkan turunnya ekskresi P oleh ginjal, sementara tikus ovariektomi yang diinfus estrogen meningkatkan ekskresi P ginjal.

Dick dkk. (1996) juga melaporkan terjadinya penurunan ekskresi P dalam urin tikus karena meningkatnya reabsorpsi P oleh ginjal dalam waktu 1-3 minggu pasca ovariektomi. Didasarkan temuan tersebut di atas menunjukkan bahwa pakan kedelai yang mengandung P relatif rendah dibanding Ca yang dikonsumsi oleh tikus panhisterektomi tidak berpengaruh negatif terhadap reabsorpsi P oleh ginjal yang ditandai tidak berbedanya jumlah P yang diekskresikan dalam urin tikus panhisterektomi dengan tikus normal.

Retensi Ca tikus panhisterektomi lebih rendah dan berbeda signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan retensi Ca tikus kontrol (Tabel 2). Turunnya absorpsi Ca intestinal yang ditandai lebih tingginya ekskresi Ca dalam feses tikus panhisterektomi sangat berperan dalam menentukan lebih rendahnya retensi Ca tikus panhisterektomi. Hartiningsih dkk. (2004) juga melaporkan bahwa ekskresi Ca dalam feses yang lebih tinggi menjadi faktor penyebab lebih rendahnya retensi Ca tikus *Sprague Dawley* yang diberi pakan teri tawar dengan rasio Ca:P= 90:30 mg/100 gram pakan atau Ca:P=3:1 selama 12 minggu. Tikus panhisterektomi juga mempunyai retensi P lebih rendah dan berbeda signifikan ( $P < 0,05$ ) dengan retensi P tikus kontrol (Tabel 2). Dalam penelitian ini ekskresi P dalam feses yang lebih tinggi dan berbeda sangat signifikan dengan tikus kontrol menjadi penyebab lebih rendahnya retensi P tikus panhisterektomi (Tabel 2). 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. Wood (2000)

melaporkan bahwa retensi atau balan Ca merefleksikan terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang selama proses remodeling tulang. Retensi Ca positif menunjukkan lebih tingginya pembentukan tulang dibanding resorpsi tulang, dan sebaliknya. Dilaporkan Dick dkk. (1996) bahwa ovariektomi pada tikus menyebabkan balan Ca negatif dan menurunkan densitas mineral tulang. O'Loughlin dan Morris (1994) juga melaporkan keterkaitan antara retensi Ca dengan akumulasi mineral dalam tulang. Lebih rendahnya retensi Ca menunjukkan lebih rendahnya akumulasi mineral Ca dalam tulang tikus panhisterektomi. Demikian halnya dengan P, sebagian besar P (85%) juga disimpan di dalam tulang, dan besarnya retensi Ca dan P menunjukkan jumlah Ca dan P yang diendapkan di dalam tulang. Tsuang dkk. (2008) juga melaporkan lebih tingginya massa tulang tikus *Wistar* yang mengkonsumsi kedelai (fitoestrogen) selama 1 bulan sebelum dan selama 2 bulan pasca ovariektomi.

Kesimpulan hasil penelitian adalah bahwa panhisterektomi pada tikus menurunkan retensi Ca dan P, meningkatkan ekskresi Ca dan P dalam feses.

#### 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

- Bolscher, M.T., Netelenbos, J.C., Barto, R., Van Buuren, L.M., 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.
- Chen, C., Kalu, D.N. 1998. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *JPET*. 286:328-333.
- Dick, I.M., John, A.St. Heal, S., Prince, R.I. 1996. The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorus handling and calcitropic hormones in the rat. *Calcif Tissue Int*. 59(3):174-178.
- Dick, I.M., 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., 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.
- Dure-Smith, B.A., Farley, S.M., Linkhart, S.G., Farley, J.R., Baylink, D.J. 1996. Calcium deficiency in fluoride-treated osteoporotic patients despite calcium supplementation. *J Clin Endocrinol Metab*. 81: 269-275.
- Harris, L.E. 1970. Nutrition Research techniques for domestic and wild animals. Vol. 1 Animal Science Dept. Utah State Univ., Logan, Utah.
- Hartiningsih, Widiyono, I., 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.
- Hattenhauer, O., Traebert, M., Heini Murer, H., Biber, J. 1999. Regulation of small intestinal Na-P<sub>i</sub> type IIB cotransporter by dietary phosphate intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 277: G756-G762.
- Heaney, R.P., Nordin, B.E.C. 2002. Calcium effects on phosphorus absorption : Implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *J Am Col Nutrition* 21(3): 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., 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. Chen, C. 1999. Ovariectomized murine model of postmenopausal calcium malabsorption. *J Bone Miner Res*. 14: 593-601.
- Kido, S., Miyamoto, K., Mizobuchi, H., Taketani, Y., Ohkido, I., Ogawa, N., Kaneko, Y., Harashima, S., Takeda, E. 1999. Identification of regulatory sequences and binding proteins in the type II sodium/phosphate cotransporter NPT2 gene responsive to dietary phosphate. *J Biol Chem* 274: 28256-28263.
- Lötscher, M. P., Wilson, P., Nguyen, S., Kaissling, B., Biber, J., Murer, H., Levi, M. 1996. New aspects of adaptation of rat renal Na-P<sub>i</sub> cotransporter to alterations in dietary phosphate. *Kidney Int*. 49: 1012-1018.
- Neer, R.M., Arnaud, C.D., Zanchetta, J.R., Prince, R., Gaich, G.A., Reginster, J.Y., Hodsman, A.B., Eriksen, E.F., Ish-Shalom, S., Genant, H.K., Wang, O., Mitlak, B.H. 2001. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 344:1434-1441.
- Nguyen, T.V., Eisman, J.A. 2000. Genetics of fracture: challenges and opportunities. *J Bone Miner Res* 15: 1253-1256.
- Nordin BE, Wishart J.M, Clifton PM, McArthur R, Scopacasa E, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M 2004. A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. *J Clin Endocrin* 61(1):123-30.
- Nordin, B.E.C., Horsman, A. Aaron. J. 1976. Diagnostic procedures in Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism : Clinical

- physiology and Diagnostic Procedures, Ed Nordin, B.E.C., Churchill Livingstone, Edinburgh: 468-524.
- O'Loughlin, P.D., Morris, H.A. 1994. Oophorectomy in the young rat impairs calcium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J. Nutr.* 124: 726-731.
- O'Loughlin, P.D. Morris, H.A. 1998. Estrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in rat. *J Physiol* 511: 313-322.
- O'Loughlin, P.D. Morris, H.A. 2003. Oophorectomy acutely increasing calcium excretion in adult rat. *J. Nutr.* 133: 2277-2280.
- Pike, J.W., Spanos, E., Colston, K.W., MacIntyre, I. Haussler, M.R. 1978. Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum  $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$  in chicks. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 235: E338-E343.
- Radanovic T., Wagner C.A., Murer H., Biber J. 2004. Regulation of intestinal phosphate transport I, segmental expression and adaptation to low-Pi diet of the type IIb Na-Pi cotransporter in mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest.* 288: G496-G500.
- Ray Sarker, B.C., Chaunan, U.P.S., 1967. A new methode for determining microquantities of calcium in biological material. *Anal Biochem* 20, 155.
- Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahata, M., Inoue, Y., Kato, S. and Miyamoto, Ken-ichi. 2004. Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary P $_i$  content in vitamin D receptor null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F39-F47.
- Scholz-Ahrens, K.E., Deling, G., Stampa, B., Helfenstein, A., Hahne, H.J., Acil, Y., Timm, W., Barkmann, R., Hassenpflug, J., Schrezenmeir, J. Gluer, C.C. 2007. Glucocorticosteroid-induce osteoporosis in adult primiparous Gottingen miniature pigs : effects on bone mineral and mineral metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E385-E395.
- Shirke, S.S, Jadhav, S.R., Jagtap, A.G. 2008. Methanolic Extract of Cminum cyminum Inhibits ovariectomy-induced bone loss in rats. *Experimental Biology and Medicine* 233: 1403-1410.
- Tsuang, Y.H., Chen, L.T., Chiang, C.J., Wu, L.C., Chiang, Y.F., Chen, P.Y., Sun, J.S., Wang, C.C. 2008. Isoflavones prevent bone loss following ovariectomy in young adults rats. *Orthop Surg.* 3: 12.
- Van den Heuvel, E.G., Schoterman, M.H., Muijs, T. 2000. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr* 130: 2938-2942.
- Watanabe, O., H.Hara, Y.Ayoma, T.Kasai. 2001. Improving effect of feeding with a phosphorylated guar gum hydrlysate 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 JB, Collin, J. F. Ghishan, F.K. 2003. Regulation of intestinal NaPi-IIb cotransporter gene expression by estrogen. *Am J Physiol Gastrointest* 285: G1317-G1324.
- Young, M.M., Jasani, C., Smith, D.A., Nordin, B.E. 1968. Some effects of ethinyl oestradiol on calcium and phosphorus metabolism in osteoporosis. *Clin Sci* 34: 411-417.