

PENGARUH PEMBERIAN KEDELAI DAN SUSU TINGGI KALSIUM TERHADAP FUNGSI TIROID DAN MASSA TULANG PADA TIKUS HIPERTIROID

The Effect of Soybean and High Calcium Milk to Thyroid Function and Bone Mass at Hyperthyroid Rat

Sri Nuryani Wahyuningrum^{*1}, Hastin Dyah Kusumawardani¹, Ismi Setianingsih¹, Alfien Susbiantonny¹,

Candra Puspitasari¹, Catur Wijayanti¹

¹Balai Litbang GAKI Magelang

Kapling Jayan, Borobudur, Magelang, Indonesia

*email : sn_yanie@yahoo.com

Submitted: September 14th, 2017, revised: February 20th, 2018, approved: February 22nd, 2018

ABSTRACT

Background. Hyperthyroidism is one of common hormonal disorders, beside of diabetes mellitus and osteoporosis. Hyperthyroidism has incidence risk 2 - 5%. Hyperthyroid case in Klinik Litbang GAKI have increased every year, there are 141 cases (29.9%) in 2014 and 181 cases (39.5%) in 2015. Hyperthyroid cause hypermetabolism in bone, improve bone replacement and increase risk of bone mineral loss. **Objective.** The purpose of this study was to made a food formula from soy and high calcium milk, then analyze the effect of formula on thyroid function and bone mass in hyperthyroid rats. **Method.** This study was experimental study using female Wistar Rat, three months old, had weight 200 ± 50 grams. The rat was adapted for one week, then treated using oral euthyrax at $50 \mu\text{g/day}$, for six weeks, to get hyperthyroid condition. After that, rats were divided into four groups randomly: (1) positive control group, (2) Propyltiouracil group (PTU), (3) food formula group (FP), (4) group PTU + FP, each group were treated for six weeks. Formula was made with the ratio of soybean: milk, 2.7: 3. Levels of TSH, fT4, PTH and calcitonin were analyzed using ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method, whereas bone mass density was analyzed using digital microradiography. **Result.** The result was obtained formula with content of calcium 0.92%, protein 28%, phosphorus 0.53%, iodine 24.2 ppm, genistein 94.4 mg/g and daidzein 36.1 mg/g. The results showed there were no significant difference between TSH, FT4, calcitonin and bone mass density between the groups before and after the intervention, however, the bone mass density in the formula group showed the highest increase trend. There was a significant difference in parathyroid hormone levels, which the highest increase trend was in the formula group. **Conclusion.** It was concluded that formula intervention for six weeks has not be able yet to improve thyroid function and bone mass density in hyperthyroid rats.

Keywords: bone density mass, hyperthyroid, milk, soy, thyroid hormone

ABSTRAK

Latar belakang. Hipertiroid merupakan masalah gangguan hormonal yang cukup banyak terjadi, disamping diabetes melitus dan osteoporosis. Hipertiroid memiliki risiko kejadian 2-5%. Kasus hipertiroid di Klinik Litbang GAKI semakin bertambah tiap tahun, terdapat 141 kasus (29,9%) di tahun 2014 dan 181 kasus (39,5%) di tahun 2015. Kondisi hipertiroid menyebabkan hipermetabolisme pada tulang, antara lain meningkatkan proses penggantian tulang hingga dua kali lipat dan meningkatkan risiko hilangnya mineral tulang. **Tujuan.** Membuat formula pangan dari bahan dasar kedelai dan susu, kemudian menilai pengaruh formula tersebut terhadap fungsi tiroid dan massa tulang pada tikus hipertiroid. **Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian pre-klinis eksperimental menggunakan hewan coba tikus putih Galur Wistar betina, usia tiga bulan, berat badan 200 ± 50 gram. Tikus diadaptasikan selama satu minggu, kemudian dibuat hipertiroid menggunakan euthyrax secara oral dengan dosis $50 \mu\text{g/hari}$, selama enam minggu.

Kondisi hipertiroid pada tikus diketahui dengan analisis kadar TSH dan fT4. Tikus dibagi empat kelompok secara random, yaitu: (1) kelompok kontrol positif, (2) kelompok Propiltiourasil (PTU), (3) kelompok formula pangan (FP), (4) kelompok PTU+FP. Tiap kelompok diberi perlakuan selama enam minggu. Formula dibuat dengan perbandingan kedelai : susu yaitu 2,7 : 3. Kadar TSH, fT4, PTH dan kalsitonin dianalisis dengan metode ELISA, sedangkan densitas massa tulang dianalisis menggunakan metode *digital microradiography*. **Hasil.** Penelitian ini mendapatkan formula dengan kandungan kalsium 0,92%, protein 28%, fosfor 0,53%, iodium 24,2 ppm, genistein 94,4 mg/g dan daidzein 36,1 mg/g. Hasil analisis menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kadar TSH, FT4, kalsitonin dan densitas massa tulang antar kelompok pada saat sebelum dan sesudah intervensi, namun densitas massa tulang pada kelompok yang diberikan formula menunjukkan tren peningkatan paling tinggi. Terdapat perbedaan bermakna kadar hormon paratiroid, dimana tren peningkatan paling tinggi terdapat pada kelompok yang diberikan formula. **Kesimpulan.** Formula yang diberikan selama enam minggu belum dapat memperbaiki fungsi tiroid dan densitas massa tulang pada tikus hipertiroid.

Kata kunci: densitas massa tulang, hipertiroid, susu, kedelai, hormon tiroid

PENDAHULUAN

Hipertiroid merupakan salah satu masalah gangguan hormonal (endokrin) yang cukup banyak terjadi, disamping diabetes melitus (DM) dan osteoporosis, dengan risiko kejadian 2 - 5 persen.¹ Penyebabnya bisa karena autoimun, secara etiologi lebih kompleks bisa disebabkan karena gabungan antara faktor genetik dan lingkungan, jumlah asupan iodium dan juga kebiasaan merokok.²⁻⁴ Prevalensi dan insiden hipertiroid pada wanita hamil sekitar 2/1000 dan 80 persen diantaranya menderita *Grave's disease*.⁵

Di Indonesia sendiri saat ini konsumsi iodium berlebih cukup mengkhawatirkan. Berdasarkan data Riskesdas 2013, sebanyak 47,3 persen wanita usia subur (WUS) dan 55,2 persen anak usia sekolah (AUS) memiliki kadar median iodium dalam urin > 200 µg/L, dimana seharusnya kisaran normal adalah 100-199 µg/L.⁶ Hal ini seiring dengan adanya peningkatan kasus hipertiroid di Klinik Litbang GAKI, yaitu terdapat 141 kasus (29,9%) di tahun 2014 dan 181 orang (39,5%) di tahun 2015. Jumlah ini lebih banyak 5-6 kali lipat dibandingkan kasus hipotiroid.⁷ Kejadian hipertiroid lebih banyak terjadi pada wanita usia 20-50 tahun.^{7,8}

Hormon tiroid berperan penting dalam mengatur metabolisme homeostasis tubuh, pertumbuhan, diferensiasi sel selama

perkembangan, termasuk perkembangan skeletal dan mengatur massa tulang pada orang dewasa. Hormon tiroid dihasilkan oleh kelenjar tiroid dalam bentuk tri-iodotiroinin (T3) dan tetra-iodotiroinin (T4/tioksine).^{9,10} Kondisi hipertiroid dimana kelenjar tiroid menghasilkan hormon tiroid dalam jumlah berlebih dapat meningkatkan metabolisme tubuh, termasuk metabolisme tulang dalam tubuh, ditandai dengan meningkatnya proses penggantian tulang hingga dua kali lipat sehingga menurunkan kepadatan tulang. Reseptor TSH dan hormon tiroid yang terdapat pada tulang menstimulasi langsung sel tulang dan meningkatkan resorpsi mineral tulang. Tingkat keparahan hipertiroid berkorelasi dengan penurunan densitas massa tulang dan meningkatkan risiko fraktur. Kondisi hipertiroid juga memicu turunnya kadar kalsium tubuh melalui ginjal yang diekskresikan lewat urin dan feses hingga tiga kali lipat.¹¹⁻¹³

Selain perlu diberikan pengobatan anti-tiroid, pasien hipertiroid juga sebaiknya menjaga diet yang tepat untuk mencegah penurunan densitas tulang. Pada penelitian ini dibuat suatu formula pangan sebagai tambahan diet bagi pasien hipertiroid dari bahan kedelai dan susu tinggi kalsium. Kedelai mengandung protein dan isoflavon. Protein merupakan sumber utama pembentukan kolagen tulang untuk menjaga kekuatan dan daya tahan tulang. Sedangkan

isoflavon pada kedelai dari jenis genistein dan daidzein merupakan zat goitrogenik alami yang dapat mencegah pembentukan hormon tiroid, sehingga dapat membantu pengurangan produksi hormon tiroid. Isoflavon jenis genistein dan daidzein berpengaruh terhadap pengurangan asupan iodium, menghambat pengambilan iodium dalam tubuh sehingga menghambat organifikasi hormon tiroid, menurunkan kadar tiroksin pada sirkulasi hati, menghambat tiroperoksidase, dan sebagai kompetitor tiroksin saat berikatan dengan protein pembawa *Thyroid Binding Globulin* (TBG).^{14,15}

Kedelai merupakan sumber makanan kaya protein namun rendah kalsium. Kalsium sebagai bahan nutrisi tulang dapat ditemukan pada berbagai jenis makanan, namun paling tinggi ditemukan pada susu sapi. Menurut *Dietary Guidelines for Americans*, susu dan produknya adalah sumber kalsium yang paling baik untuk memenuhi kebutuhan mineral tulang. Selain itu susu juga mengandung mineral lain yang dibutuhkan oleh tulang seperti vitamin D, fosfat, potasium, magnesium, dan lain-lain.¹⁶ Formulasi produk nabati dan hewani dalam penelitian ini diharapkan dapat memperbaiki fungsi tiroid dan memenuhi kebutuhan energi, protein, dan zat gizi untuk tulang. Formula pangan dalam penelitian ini yang berupa campuran produk nabati dan hewani diharapkan dapat memenuhi kebutuhan energi, protein dan nutrisi tulang, serta membantu memperbaiki fungsi tiroid pada kasus hipertiroid.

METODE

Pembuatan Formula

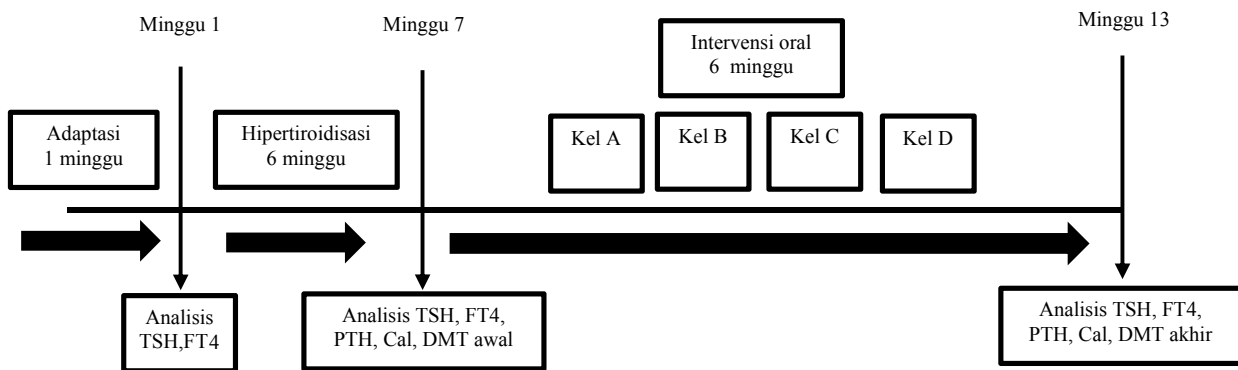
Bahan utama pembuatan produk pangan adalah kedelai lokal dan susu skim tinggi kalsium dengan perbandingan susu : kedelai = 3 : 2,7. Kombinasi pangan ini dibuat berdasarkan Angka Kecukupan Gizi (AKG) kalsium (Ca) pada manusia yaitu sebesar 1200 mg/hari,¹⁷ yang dikonversikan ke tikus, dan disesuaikan

dengan kandungan kalsium dalam susu skim tinggi kalsium yang digunakan. Sedangkan jumlah kedelai yang digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya,¹⁸ dengan kadar isoflavon kedelai sebagai sumber goitrogen yang dapat menghambat sintesis hormon tiroid. Jumlah formula yang diberikan kepada tikus adalah tiga gram susu skim tinggi kalsium dan tepung kedelai 2,7 gram. Jumlah total yang diberikan adalah 5,7 gram formula pangan per 200 gr BB tikus per hari. Kandungan zat gizi formula pangan dianalisis terlebih dahulu sebelum diberikan pada tikus. Analisis zat gizi yang dilakukan antara lain: proksimat, asam amino, kalsium, fosfor, iodium dan isoflavon.

Pemilihan Hewan Coba

Desain penelitian adalah eksperimental murni dengan rancangan penelitian *randomized control group pretest-post test design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina galur Wistar usia tiga bulan yang dikembangbiakkan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Tikus dipilih sebagai sampel penelitian karena memiliki kelengkapan organ, kebutuhan nutrisi dan metabolisme yang cukup dekat dengan manusia. Selain itu kejadian hipertiroid dan osteoporosis lebih banyak terjadi pada wanita dewasa, sehingga diharapkan pemilihan tikus betina dewasa bisa lebih menggambarkan kondisi yang ada. Pengambilan sampel dilakukan secara *simple randomization*, masing-masing tikus mendapat kesempatan yang sama untuk masuk ke masing-masing kelompok. Kriteria inklusi hewan coba adalah tikus jenis Wistar, betina, usia tiga bulan, berat badan 230 ± 20 gram, belum pernah digunakan untuk penelitian, sehat (aktif bergerak).

Penentuan besar sampel menggunakan rumus besar sampel untuk variabel kontinyu.¹⁹ Jumlah minimal masing-masing kelompok adalah lima ekor dengan cadangan *drop-out* dua ekor/kelompok, jadi jumlah pada masing-



Gambar 1. Alur Penelitian

Keterangan :

TSH: *thyroid stimulating hormone*; fT4: *free T4*; PTH: *parathyroid hormone*; Cal: *calcitonin*; DMT: *densitas massa tulang*; PTU: *propylthiouracil*

- Kel A : kelompok kontrol positif (tikus hipertiroid tanpa intervensi)
 Kel B : kelompok kontrol negatif (diberi PTU dosis 9 mg/kgBB/hari)
 Kel C : kelompok formula pangan (FP)
 Kel D : kelompok formula pangan + PTU

masing kelompok adalah tujuh ekor dengan jumlah kelompok perlakuan sebanyak empat kelompok.

Berikut ini adalah alur perlakuan pada hewan coba:

Cara membuat tikus hipertiroid yaitu tikus diberi *euthyrax* dengan dosis toksik 50 µg/individu/hari, selama enam minggu.²⁰ *Euthyrax* dilarutkan dalam dua ml akuades, kemudian diberikan secara oral melalui sonde.

Berat badan tikus yang diukur setiap tujuh hari sekali baik selama masa adaptasi maupun selama perlakuan. Penimbangan menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,01.

Pemeliharaan Tikus

Tikus ditempatkan pada kandang individu dengan suhu ruangan yang terkontrol, ruangan dilengkapi dengan AC (*air conditioner*). Tikus diberikan minum berupa akuades secara *ad libitum* dan makanan sebanyak 15 gram/hari. Sumber pakan utama tikus adalah

pakan standar AIN-93 yang dapat memenuhi kecukupan nutrisi tikus sehari-hari. Pakan AIN-93 dipesan khusus di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) UGM dengan modifikasi tanpa penambahan kalsium, fosfor dan iodium. Tujuannya untuk meminimalisir bias asupan zat gizi mikro dan mineral tersebut pada tikus, sehingga bisa dipastikan bahwa asupan kalsium, fosfor dan iodium hanya berasal dari formula yang diberikan.

Cara Pemberian Intervensi

Formula diberikan pada tikus sebanyak 5,7 gram per 200 gram BB per hari dengan cara dilarutkan dalam akuades dan diberikan melalui sonde oral sehingga dosis tersebut dipastikan terkonsumsi semua oleh tikus. Teknik sonde (menggunakan jarum suntik yang ujungnya sudah dibuat tumpul) dipilih karena lebih aman, praktis, dan tidak menyakitkan hewan coba. Intervensi diberikan selama enam minggu setiap hari, pada jam 8 pagi dan 12 siang. Pemberian

intervensi dibagi menjadi dua kali pemberian agar lambung tikus tidak terlalu penuh, jadi setiap sekali pemberian adalah setengah jumlah 5,7 gram per 200 gram BB per hari. Hasil penimbangan berat badan tikus tiap seminggu sekali dijadikan sebagai dasar jumlah pemberian formula pada minggu selanjutnya.

Analisis Kadar TSH, fT4, PTH dan Calcitonin

Sampel yang digunakan adalah serum darah. Darah diambil dari sinus orbitalis (bagian pojok mata) sebanyak dua cc menggunakan tabung mikrohematokrit yang mengandung *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) sebagai anti koagulan. Pengambilan darah menggunakan alat yang aseptik. Sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm sehingga didapatkan serum. Serum dimasukkan ke dalam tabung serum untuk disimpan di dalam freezer pada suhu -20°C sampai analisis selanjutnya. Analisis menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) di Laboratorium Biokimia BP2GAKI Magelang. Reagen pemeriksaan dan manual prosedur

yang digunakan berdasarkan reagen Cusabio, US untuk serum darah tikus.

Analisis Densitas Massa Tulang

Analisis densitas massa tulang tikus dilakukan dengan menggunakan *digital microradiography* di Laboratorium Fisika Citra, Jurusan Fisika, Fakultas MIPA UGM. Tulang yang digunakan adalah bagian *femur* tikus. Untuk mendapatkan *femur*, tikus dimatikan kemudian dilakukan pembedahan.

Persetujuan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan Persetujuan Etik dari Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan No. LB.02.01/5.2/KE.216/2016, tanggal 19 April 2016.

HASIL

1. Kandungan Gizi dalam Formula Pangan

Kandungan gizi dalam formula dibuat berdasarkan perhitungan AKG kalsium dan dosis kedelai yang dapat memberikan efek goitrogenik pada manusia yang kemudian dikonversikan untuk tikus. Kandungan gizi dalam formula dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Gizi Formula

Kandungan Gizi	Jumlah	%AKG pada manusia per 30 gram saji (±3 sendok makan)
Lemak (%)	13,71	5,6
Protein (%)	28,07	13
Air (%)	5,49	0,06
Abu (%)	5,23	-
Karbohidrat (%)	47,49	3,6
Kalsium (%)	1,3	35
Phospor (%)	0,53	23
Iodium (ppm)	24,21	16
Isoflavon :		
Daidzein (µg/g)	36,1	-
Genistein (µg/g)	94,4	-

Kandungan gizi yang dianalisis dalam formula terbatas hanya makronutrien dan mineral yang berkaitan dengan metabolisme fungsi tiroid dan metabolisme tulang. Selain itu juga

dilakukan analisis kadar asam amino sebagai komponen penyusun protein. Kandungan asam amino pada formula pangan dapat dilihat pada Tabel 2.

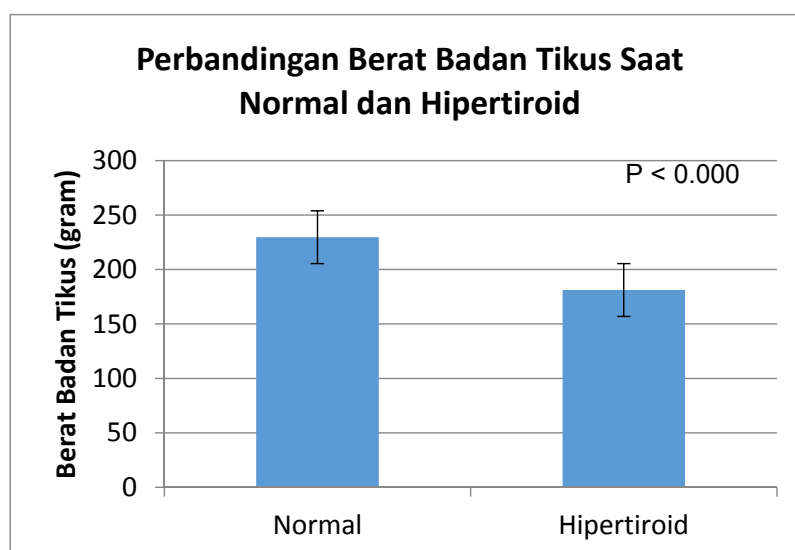
Tabel 2. Kandungan Asam Amino dalam Formula

No.	Jenis Asam Amino	Formula (mg/g)	No.	Jenis Asam Amino	Formula (mg/g)
1	Asparticacid	0,22	9	Tyrosin	0,18
2	Glutamicacid	0,65	10	Metionin	0,03
3	Serin	0,11	11	Valin	0,10
4	Histidin	0,07	12	Phenyalanin	0,12
5	Glisin	0,08	13	Ileusin	0,09
6	Threonin	0,08	14	Leusin	0,20
7	Arginin	0,13	15	Lysin	0,17
8	Alanin	0,14			

Terdapat 15 jenis asam amino yang terkandung dalam formula, diantaranya terdapat tirosin dan fenilalanin yang berperan dalam pembentukan hormon tiroid.

2. Berat Badan dan Fungsi Tiroid Hewan Coba Fase Hipertiroidisasi

Berikut ini adalah perbandingan berat badan tikus pada kondisi normal (sebelum intervensi *euthyrax*) dibandingkan kondisi hipertiroid (setelah 6 minggu pemberian *euthyrax*).



Gambar 2. Perubahan Berat Badan Tikus pada saat Normal dan Hipertiroid

Dari Gambar 2, terlihat penurunan berat badan tikus signifikan setelah hipertiroidisasi

selama enam minggu ($P < 0,000$). Selama pemeliharaan, kondisi suhu ruangan tercatat

25°C dan kelembaban ruangan 60-65%. Berdasarkan pengamatan peneliti pada saat awal adaptasi, perilaku tikus lebih tenang dan tidak memberikan perlawanan. Sedangkan pada saat kondisi hipertiroid, perilaku tikus menjadi

lebih agresif, ditunjukkan dengan perilaku sering menggigit dan berontak saat dipegang untuk penimbangan berat badan dan pengambilan darah. Perubahan variabel TSH dan fT4 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kondisi Fisiologis Fungsi Tiroid pada saat Hipertiroid

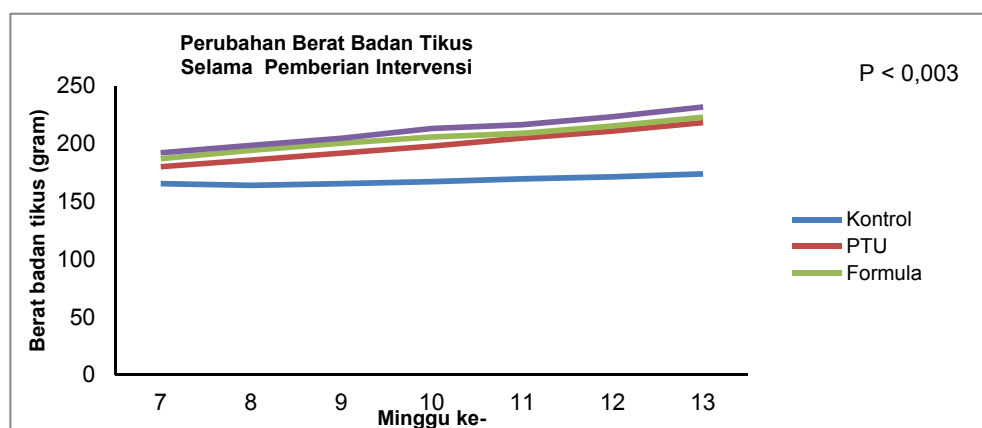
Variabel	Kadar		P
	Normal	Hipertiroid	
TSH (μ IU/l)	0,66 $\pm$ 0,48	0,21 $\pm$ 0,09	0,000*
fT4 (pmol/l)	6,89 $\pm$ 0,77	11,06 $\pm$ 4,98	0,000*

Keterangan: *P sig < 0,05, *paired t-test*

Setelah enam minggu pemberian *euthyrax* terdapat penurunan kadar TSH dan peningkatan kadar fT4 secara signifikan. Secara teori, adanya tanda-tanda penurunan berat badan, penurunan kadar TSH dan peningkatan kadar fT4 secara signifikan berarti bahwa tikus sudah dalam kondisi hipertiroid primer. Selanjutnya bisa diteruskan proses pemberian intervensi.

3. Perubahan Berat Badan, Fungsi Tiroid dan Densitas Massa Tulang Sebelum dan Setelah Intervensi

Pada fase intervensi, tikus dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing diberikan intervensi sesuai dengan pengelompokannya selama enam minggu. Berikut ini adalah tren perubahan rata-rata berat badan tikus selama masa intervensi.



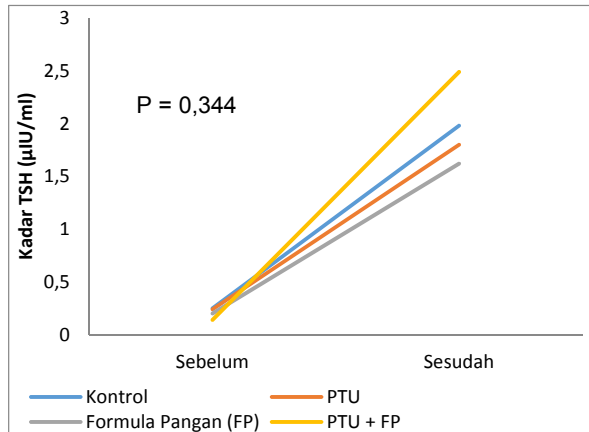
Keterangan: P sig < 0.05 (ANOVA)

Gambar 3. Perubahan Berat Badan Tikus Hipertiroid selama Pemberian Intervensi

Pada Gambar 3 tampak perubahan berat badan tikus hipertiroid yang diberikan intervensi selama enam minggu. Pada kelompok yang diberikan intervensi berupa PTU, formula, serta gabungan antara formula dan PTU, menunjukkan adanya peningkatan berat badan tikus secara

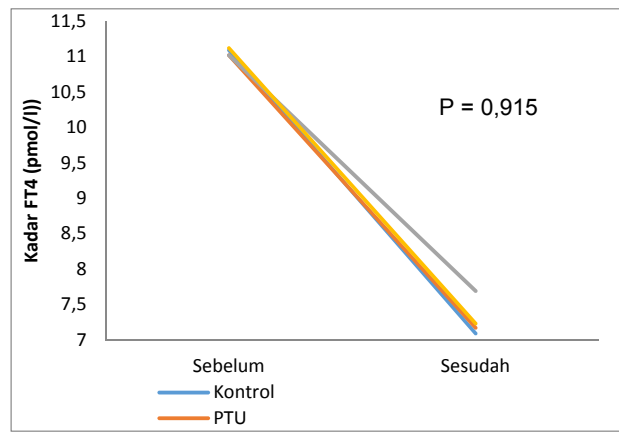
signifikan ($P < 0,05$).

Kondisi fisiologis hormonal dan densitas massa tulang pada tikus hipertiroid sebelum dan sesudah diberikan intervensi adalah sebagai berikut:



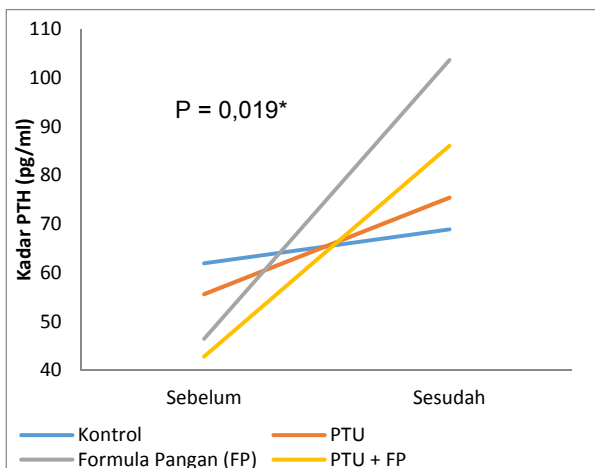
Keterangan: *P sig < 0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallis)

Gambar 4. Perubahan Kadar TSH Sebelum dan Sesudah Intervensi



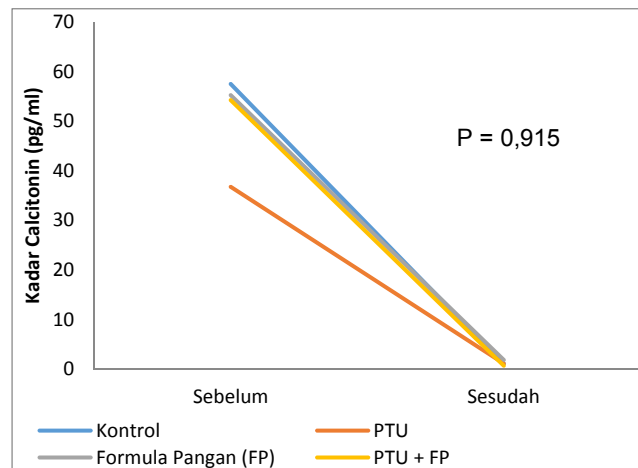
Keterangan: *P sig < 0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallis)

Gambar 5. Perubahan Kadar FT4 Sebelum dan Sesudah Intervensi



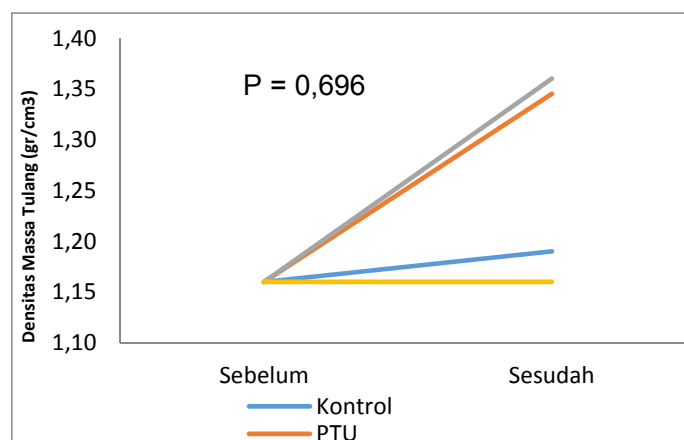
Keterangan: *P sig < 0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallis)

Gambar 6. Perubahan Kadar PTH Sebelum dan Sesudah Intervensi



Keterangan: *P sig < 0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallis)

Gambar 7. Perubahan Kadar Calcitonin Sebelum dan Sesudah Intervensi



Keterangan: *P sig < 0,05 (ANOVA, Kruskal-Wallis)

Gambar 8. Perubahan Kadar Densitas Massa Tulang Sebelum dan Sesudah Intervensi

Perubahan kadar TSH, FT4, kalsitonin selama pemberian intervensi tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol. Demikian juga dengan densitas massa tulang. Namun, pada Gambar 8 tampak bahwa tren peningkatan densitas massa tulang paling terlihat pada kelompok yang diberikan formula pangan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang cenderung statis. Perbedaan bermakna hanya terlihat pada variabel PTH, dimana PTH berperan pada pengaturan kadar kalsium dalam darah.

PEMBAHASAN

1. Kandungan Gizi dalam Formula Pangan

Nutrisi yang dianalisis dalam penelitian meliputi makronutrien dan mikronutrien yang berkaitan dengan fungsi tiroid dan massa tulang. Kandungan nutrisi dalam formula makanan cukup lengkap dengan adanya makronutrien seperti lemak, protein, air, karbohidrat dan 15 macam asam amino serta kandungan mikronutrien seperti kalsium, fosfor dan iodium.

Asam Amino

Asam amino berperan utama dalam sintesis protein dalam tubuh, selain itu juga sebagai prekursor sebagian besar koenzim, hormon, dan asam nukleat. Protein yang tersintesis dari asam amino akan menjalankan fungsi khususnya yaitu membangun serta memelihara sel-sel dan jaringan tubuh. Pencampuran bahan nabati dan hewani dalam formula mempunyai keuntungan diantaranya protein hewani dari susu dapat membantu proses hidrolisis dalam tubuh karena memiliki daya cerna yang lebih baik daripada protein nabati dari kedelai.²²

Asam amino dikelompokkan dalam tiga jenis yaitu asam amino esensial, asam amino semi esensial, dan asam amino non-esensial. Terdapat sembilan jenis asam amino esensial antara lain leusin, isoleusin, valin, lisin, threonin, triptofan, metionin, fenilalanin dan histidin, dimana tujuh

jenis diantaranya sudah terkandung dalam formula pangan. Asam amino semi-esensial berfungsi menghemat penggunaan asam amino esensial untuk proses kehidupan jaringan orang dewasa, namun tidak cukup untuk pertumbuhan anak-anak. Misalnya sistein dapat menghemat penggunaan metionin dan tirosin dapat menghemat penggunaan fenilalanin. Asam amino non-esensial dalam proses sintesisnya dapat dilakukan oleh tubuh sepanjang bahan dasarnya tersedia cukup dalam tubuh yaitu asam lemak dan sumber nitrogen.²³

Hormon tiroid dapat diproduksi jika bahan-bahan penyusun seperti tirosin tersedia dalam jumlah yang cukup. Tirosin merupakan salah satu asam amino non-esensial yang disintesis oleh tubuh yang keberadaannya berasal dari asam amino esensial yaitu fenilalanin dan iodium dalam makanan. Tirosin dapat bekerja ketika jumlah asam amino fenilalanin dalam tubuh tercukupi. Tirosin dan iodium dibutuhkan untuk mekanisme konversi T4 menjadi T3 di tingkat selular.²⁴

Isoflavon

Isoflavon merupakan sumber goitrogen yang dapat membantu penghambatan produksi hormon tiroid. Pada pasien hipertiroid, konsumsi bahan makanan yang mengandung goitrogen sangat dianjurkan, salah satunya yaitu kedelai. Dalam penelitian ini, kandungan isoflavon genistein dan daidzein secara berturut-turut adalah 94,4 µg/gr dan 36,1 µg/gr. Hasil ini lebih sedikit jika dibandingkan dengan hasil pemeriksaan kandungan isoflavon dari kedelai mentah. Kandungan isoflavon genistein dalam kedelai mentah sebesar 800 µg/gr.²⁵ Penurunan kadar isoflavon dalam formula dimungkinkan karena adanya proses pemasakan. Kandungan isoflavon genistein dipengaruhi oleh jenis kedelai yang dipakai, ukuran bahan, cara pengolahan, adanya proses fermentasi, cara ekstraksi, dan banyak faktor lainnya.²⁶ Faktor lain yang

mempengaruhi kandungan isoflavon adalah tempat tumbuh, iklim, dan tingkat kematangan kedelai.²⁷

Kelompok makanan kedelai mengandung genistein dan daidzein yang berpengaruh terhadap fungsi tiroid diantaranya dengan cara mengurangi asupan iodium, menghambat organifikasi hormon tiroid, meningkatkan *loss of thyroxine* pada sirkulasi hati, menghambat tiroperoksidase, dan sebagai kompetitor T4 saat berikatan dengan TBG.^{28,29} Dalam penelitian Silverstein *et al* disebutkan bahwa pemberian protein kedelai yang mengandung isoflavon pada kera ovariektomi selama 34 bulan, dapat mencegah peningkatan hormon T4.³⁰

Kalsium, Fosfor dan Iodium

Mineral dalam tubuh memegang peranan penting dalam pemeliharaan fungsi tubuh, baik pada tingkat sel, jaringan, organ maupun fungsi tubuh secara keseluruhan. Kalsium, fosfor dan magnesium adalah bagian dari tulang, serta iodium merupakan bahan utama pembentukan hormon tiroid.¹² Fungsi dan metabolisme kalsium dan fosfor sangat erat berhubungan. Sebagian besar kedua unsur ini terdapat sebagai garam kalsium fosfat di dalam jaringan keras tubuh yaitu tulang dan gigi.

Kebutuhan harian kalsium berdasarkan AKG yang dianjurkan untuk wanita usia subur adalah 1000-1200 mg dan sebanyak 700-800 mg kalsium dipertukarkan untuk proses pembentukan dan resorpsi.^{8,12} Susu dan hasil olahannya seperti keju merupakan sumber kalsium yang utama, disamping itu sereal, kacang-kacangan dan hasil olahannya (tahu, tempe, dan lain-lain) juga merupakan sumber kalsium yang baik. Dalam penelitian ini, kandungan kalsium dapat mencukupi ± 35 persen AKG tubuh (per 30 gram saji). Sebanyak 99 persen kalsium dalam tubuh terdapat dalam bentuk tulang yang disimpan dalam bentuk $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Walaupun suplemen kalsium dianjurkan untuk mencegah atau

memperlambat terjadinya osteoporosis, tetapi kegunaannya terbatas. Kalsium tidak diserap dengan mudah, ketika diberikan dalam bentuk kalsium karbonat, yang merupakan bentuk paling sering digunakan dalam suplemen. Kalsium dalam susu merupakan cara yang paling efektif dalam meningkatkan kadar kalsium. Peningkatan asupan kalsium dapat menurunkan tingkat *marker* resorpsi tulang, terutama pada orang yang sebelumnya asupan kalsiumnya kurang. Efek ini dimediasi oleh penghambatan sekresi hormon paratiroid.^{10,11}

Fosfor terkandung dalam hampir semua jenis makanan, terutama bahan makanan yang mengandung protein tinggi seperti daging, ikan, telur, susu dan hasil olahannya, serta kacang-kacangan dan sereal. Kebutuhan harian fosfor untuk remaja dan dewasa adalah 400-500 mg.⁶ Kandungan fosfor dalam formula penelitian ini bersumber dari susu dan kedelai, dapat mencukupi ± 23 persen AKG fosfor dalam tubuh.

Iodium merupakan salah satu mineral mikro yang dibutuhkan dalam pembentukan hormon tiroid, oleh karena itu ketersediaan iodium dalam tubuh harus cukup dan berkesinambungan. Tubuh manusia yang sehat mengandung 15-20 mg iodium. Kelenjar tiroid harus mendapatkan kurang lebih 60 μg iodium tiap harinya untuk menyeimbangkan kebutuhan tiroksin.¹⁴ Kebutuhan harian untuk remaja dan dewasa adalah 150 μg /hari. Kandungan iodium formula pangan adalah 24,2 ppm atau 16 persen AKG iodium dalam tubuh. Kandungan dalam formula cukup rendah, sehingga aman untuk dikonsumsi oleh pasien hipertiroid.

2. Perubahan Berat Badan Tikus

Proses hipertiroidisasi selama enam minggu menyebabkan berat badan tikus berkurang secara signifikan (Gambar 2, $p < 0,000$). Hal ini disebabkan kondisi hipertiroid memicu adanya hiperaktivitas dan hiperstimulasi pada saluran pencernaan sehingga menyebabkan kondisi

malabsorpsi dan diare.²¹ Penyerapan pakan menjadi tidak optimal karena tidak tercerna dengan baik sehingga berpengaruh terhadap berat badan tikus. Adanya penurunan berat badan setelah hipertiroidisasi, serta peningkatan kadar fT4 dan penurunan TSH secara signifikan (Tabel 3), mengindikasikan bahwa tikus sudah berhasil dibuat dalam kondisi hipertiroid.

Setelah dalam kondisi hipertiroid, tikus diberi intervensi selama enam minggu. Terdapat peningkatan signifikan berat badan pada semua kelompok tikus yang diberi intervensi, kecuali pada kelompok kontrol yang tidak diberi intervensi (Gambar 3, $p < 0,005$). Hal ini menjadi salah satu indikasi bahwa intervensi yang diberikan, baik berupa PTU, formula, maupun gabungan keduanya, dapat memberikan dampak positif terhadap normalisasi metabolisme pencernaan tikus. Fungsi pencernaan yang awalnya pada kondisi hipertiroid bekerja secara hiperaktif, sudah mulai berfungsi normal dan berpengaruh terhadap optimalisasi absorpsi makanan. Absorpsi makanan yang optimal berdampak terhadap peningkatan berat badan tikus. Berbeda dengan kelompok kontrol yang tidak diberikan intervensi apapun, berat badan tikus pada kelompok kontrol tidak mengalami perubahan bermakna. Tikus hipertiroid yang dibiarkan tidak diberikan intervensi selama enam minggu cenderung tidak mengalami peningkatan berat badan.

3. Fisiologi Hormonal dan Densitas Massa Tulang Tikus

Dalam penelitian ini, pemberian formula kedelai plus susu tinggi kalsium selama enam minggu belum dapat memberikan perubahan bermakna terhadap kadar TSH dan FT4 tikus, menunjukkan pola yang hampir sama pada keempat kelompok (Gambar 4, 5). Utiger dalam tulisannya menyebutkan bahwa pada subjek normal yang diberikan intervensi hormonal atau terapi lainnya, dalam satu bulan setelah

intervensi dihentikan maka semua indikator akan kembali seperti awal sebelum pemberian intervensi.³¹ Fenomena tersebut terjadi pada kelompok kontrol yang tidak diberikan intervensi apapun. Kondisi tersebut menjadi salah satu keterbatasan dalam penelitian ini yang menyebabkan perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan tidak terlalu terlihat.

Penelitian lainnya menyebutkan bahwa pemberian diet kedelai sebanyak 30 persen dan 50 persen pada mencit selama sembilan minggu dapat menurunkan kadar hormon T4 dan meningkatkan kadar TSH.³² Pemberian genistein secara *in vivo* dapat menyebabkan inaktivasi rTPO dan mengurangi aktivitas enzim TPO. Aktivitas TPO berkurang hingga 50 persen pada tikus jantan maupun betina yang diberikan diet kedelai. Hal ini menyebabkan adanya penurunan kadar hormon tiroid.³³

Proses hipertiroidisasi selama enam minggu juga dapat mempengaruhi kondisi fungsi tiroid baik secara klinis maupun fisiologis dengan adanya gejala hipertiroid primer, namun ternyata belum cukup dapat mempengaruhi proses osteoporosis pada tulang tikus. Tingkat densitas massa tulang tikus yang diperiksa saat kondisi hipertiroid belum menunjukkan perubahan berarti dibandingkan dengan kondisi normal. Dalam penelitian lainnya dijelaskan bahwa penurunan densitas massa tulang merupakan gejala akhir osteoporosis, dimana sebelumnya diawali dengan perubahan fisiologis hormonal yang berhubungan dengan metabolisme tulang. Perubahan fisiologis hormonal merupakan *marker* yang timbul lebih cepat daripada perubahan densitas massa tulang.³⁴

Dalam penelitian Pirro *et al* disebutkan bahwa densitas massa tulang justru meningkat pada kondisi hipertiroid, dimana secara statistik menunjukkan kadar FT4 normal hingga tinggi tidak berhubungan dengan densitas massa tulang.³⁵ Menurutnya, densitas massa tulang merupakan proses yang lama dari *bone turn*

over. Dalam penelitian Zhang *et al* disebutkan bahwa penurunan kadar TSH berpengaruh pada kondisi tulang, dimana TSH lebih berpengaruh pada resorpsi tulang dibandingkan pada formasi tulang.³⁶ Kekuatan tulang meningkat dengan meningkatnya kandungan mineral. Adanya gangguan pada TSH mempengaruhi metabolisme kalsium dan fosfor sehingga kekuatan tulang menurun. Penelitian lain menyebutkan bahwa kelebihan hormon tiroid dapat mempercepat pergantian tulang sehingga pada penderita hipertiroid ditemukan adanya penurunan densitas massa tulang. Densitas massa tulang pada hipertiroid subklinis lebih rendah dibandingkan pada eutiroid.³⁷

Pemberian terapi anti-tiroid pada beberapa penelitian menunjukkan adanya peningkatan densitas massa tulang. Ock *et al* menyatakan bahwa hipertiroid merupakan faktor risiko osteoporosis karena adanya peningkatan pergantian tulang.³⁸ Densitas massa tulang pada sampel penelitian meningkat setelah pemberian terapi anti-tiroid pada studi longitudinal. Pada penelitian lain, pemberian isoflavon pada wanita osteoporosis memberikan hasil peningkatan densitas massa tulang.³⁹ Isoflavon kedelai dapat meningkatkan densitas massa tulang melalui kemampuannya menurunkan *bone resorption* karena isoflavon kedelai mempunyai kemiripan biologis dan kimiawi dengan estrogen.⁴⁰ Selain isoflavon, kandungan kalsium dan fosfor pada formula pangan ini kemungkinan berpengaruh pada homeostatis tulang pada hewan coba, sehingga terjadi keseimbangan dalam *remodeling* atau peremajaan tulang. Asupan kalsium dan fosfor dapat berperan pada peningkatan kadar kalsium dan fosfor dalam darah, yang dapat menunjang deposisi kalsium ke dalam tulang.⁴¹ Talbot *et al* membandingkan perubahan bioavailabilitas kalsium dan serum PTH pada subyek yang diberikan 500 mg kalsium dari susu cair, yoghurt, susu bubuk dengan penambahan kalsium-sitrat, pil kalsium karbonat dan susu kedelai buatan.⁴² Setelah

12 hari pemberian intervensi, konsumsi susu bubuk dengan penambahan kalsium-sitrat dapat meningkatkan serum kalsium dan menurunkan kadar PTH paling signifikan. Yoghurt dan pil kalsium karbonat juga memberikan hasil yang signifikan. Pengaruh intervensi tersebut menghilang setelah dua hari. Produk susu yang diperkaya kalsium sitrat dapat meningkatkan serum kalsium dan lebih tahan lama, serta dapat menekan PTH lebih lama. Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa susu bubuk yang diperkaya kalsium sitrat memiliki bioavailabilitas kalsium yang lebih tinggi dibandingkan garam kalsium.

Salah satu kondisi lain yang menyertai hipertiroid adalah meningkatnya kadar kalsium darah (hiperkalsemia), dimana gejala ini dijadikan salah satu diagnosis klasik hipertiroid primer. Hal ini terjadi karena adanya peningkatan pergantian tulang karena tingginya kadar hormon tiroid. Peningkatan pergantian tulang berisiko terhadap berkurangnya massa tulang, jika tidak diimbangi dengan adanya resorpsi dan formasi tulang.⁴³⁻⁴⁵ Kadar kalsium darah dapat dideteksi melalui kadar PTH yang dihasilkan oleh kelenjar paratiroid.

Kelenjar tiroid dan paratiroid memiliki letak yang saling berdekatan, namun keduanya memiliki fungsi independen yang saling berkaitan. Kelenjar tiroid beraksi secara makroskopik dan mikroskopik terhadap berbagai macam pengaruh keadaan, utamanya menjaga homeostatis metabolisme seluruh tubuh. Sedangkan kelenjar paratiroid berperan dalam menjaga homeostasis kalsium ekstraseluler. Kelenjar paratiroid mendeteksi perubahan kadar kalsium dalam darah melalui CaR (*Calcium-sensing receptor*), yang nantinya dapat memicu sekresi PTH.^{46,47} Hormon tiroid secara mikro juga berperan langsung dalam metabolisme tulang, yaitu dengan menstimulasi resorpsi tulang karena mempunyai reseptor di osteoblas dan osteoklas, selain itu TSH juga berperan langsung

dalam formasi tulang dan resorpsi tulang dengan adanya TSH reseptor di prekursor osteoblas dan osteoklas.¹²

Peningkatan kadar PTH pada kelompok perlakuan mengindikasikan bahwa kadar kalsium darah mulai berkurang. Penurunan kadar kalsium darah yang ditandai dengan peningkatan kadar PTH dan penurunan kalsitonin merupakan pertanda baik, dimana jika kadar kalsium tetap tinggi (hiperkalsemia) dalam waktu yang lama, akan menghasilkan efek reduksi susunan massa tulang, sehingga menyebabkan osteoporosis. Pada saat kondisi kalsium darah menurun, produksi PTH akan meningkat, dan demikian sebaliknya. Namun jika kadar kalsium darah meningkat terlalu tinggi, hormon kalsitonin akan disekresikan dari kelenjar tiroid, untuk memperlambat pelepasan kalsium dari tulang. Kadar kalsitonin pada semua kelompok mengalami penurunan, namun tidak berbeda antar kelompok. Hal ini mengindikasikan bahwa pada saat kondisi hipertiroid, tubuh tikus mengandung kadar kalsium darah cukup tinggi sebagai dampak dari adanya pelepasan kalsium tulang, kemudian menurun setelah kondisi normal kembali.

Dalam penelitian Feng *et al* mencit yang diberikan diet tinggi kalsium dan injeksi PTH eksogen (80 ug/kg/hari) selama empat minggu, dapat meningkatkan volume densitas massa tulang, volume tulang dan formasi tulang.⁴⁸ Peningkatan formasi tulang berarti bahwa terdapat peningkatan jumlah osteoblas, yang menghasilkan peningkatan proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Diet tinggi kalsium bersamaan dengan injeksi eksogen PTH dapat berperan secara sinergi dalam meningkatkan regulasi CaSR dan ekspresi PTHR, yang selanjutnya berdampak pada aktivasi signal yang relevan seperti meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoblas dan meningkatkan formasi tulang secara optimal. Dalam penelitian lainnya, diketahui bahwa suplementasi Ca pada

wanita menopause dapat mencegah osteoporosis dan meningkatkan densitas massa tulang.⁴⁹

KESIMPULAN

Formula berisi susu tinggi kalsium dan kedelai (dengan perbandingan 3:2,7) yang diberikan selama enam minggu pada tikus hipertiroid, belum terbukti dapat membantu menormalkan fungsi tiroid dan meningkatkan densitas massa tulang secara signifikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Sugianto, SKM, M.Sc.PH, selaku Kepala Balai Litbang GAKI, Prof. drh. Pudji Astuti, MP, dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM selaku konsultan dalam penelitian, Dr. Gede Bayu Saputra, Kepala Laboratorium Fisika Citra Fakultas MIPA UGM, Ibu Dr. dr. Suryati Kumorowulan, M.Biotech, teman-teman analis di Laboratorium Biokimia, serta Bapak Yulianto, laboran di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cooper DS. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2003; 362: 459-68.
2. Brix TH, Hegedus L. Twin Studies as a Model for Exploring the Etiology of Autoimmune Thyroid Disease. *Clin Endocrinol*. 2012; 76: 457-64.
3. Laurberg P, Pedersen KM, Vestergaard H, Sigurdson G. High Incidence of Multinodular Toxic Goitre in the Elderly Population in a Low Iodine Intake Area vs High Incidence of Graves Disease in the Young in a High Iodine Intake Area: Comparative Surveys of Thyrotoxicosis Epidemiology in East-Jutland Denmark and Iceland. *J Intern Med*. 1991; 229: 415-20.
4. Brix TH, Hansen PS, Kyvik KO, Hegedus S L. Cigarette Smoking and Risk of Clinically Overt Thyroid Disease: A Population-Based

- Twin Case-Control Study. *Arch Intern Med*. 2002; 160: 661-66.
5. Mestman JH. Hyperthyroidism Inpregnancy. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab*. 2004; 18: 267-88.
6. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Laporan Riset Kesehatan Dasar, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013.
7. Balai Litbang GAKI. Laporan Tahunan Tahun 2014, Laporan Tahunan Tahun 2015. Magelang: Balai Litbang GAKI. 2014-2015.
8. Kumar P, Clark M. *Endocrine Disease - Thyroid Dysfunctions: Essentials of Clinical Medicine (5th Edition)*, Elsevier Publication, 2011; 619-29
9. Jameson JL , Weetman AP. *Disorder of the Thyroid Gland, in Harrison's Endocrinology 2nd ed.* editor Jameson JL. New York: McGraw Hill; 2010. p. 62.
10. Brassil MJ, Williams GR. A Report : Advances in Our Understanding of Hyperthyroidism-Associated Bone Loss. *Thyroid Disorder US Endocrinology*. 2010; 114-17.
11. Gorka J, Taylor-Gjerve RM, Arnason T. Metabolic and Clinical Consequences of Hyperthyroidism on Bone Density. *Int J of Endocrinol*. 2013; 1: 1-11.
12. Dhanwal DK. Thyroid Disorder and Bone Mineral Metabolism. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011; (suppl2) : S107-12.
13. Cardoso LF, Maciel LMZ, de Paula JA. The Multiple Effects of Thyroid Disorder on Bone and Mineral Metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metav*. 2014; (58) 5 : 452-63.
14. Gropper SS, Smith JL, Groff JL. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. USA: Wadsworth; 2005.
15. Tubili C, Morviducc L, Nardone MR, Tubili F, Falco DD, Folco UD. Thyroid and Food: a Mediterranean Perspective. *Mediterr J Nutr Metab*. 2012; 5(3):195-203.
16. NICHD. *Building Strong Bones: Calcium Information for Health Care Providers*. US Department of Health and Human Services. 2006
17. Kementerian Kesehatan RI. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 75 Tahun 2013 tentang Angka Kecukupan Gizi yang Dianjurkan Bagi Bangsa Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan; 2013.
18. Fitzpatrick M. Soy Formula and the Effect of Isoflavones on Thyroid. *New Zealand Medical Journal*. 2000; 113(1103): 24-6.
19. Shah H. Sample Size in Animal Studies: How to Calculate the Sample Size for Animal Studies. Technical Notes, *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 2011; (1) : 35-9.
20. Huffman LJ, Judy DC, Brumbaugh K, Frazer DG, Reynolds JS, McKinney WG, et al. Hyperthyroidisms Increases The Risk of Ozone-Induced Long Toxicity in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 173(1): 18-26.
21. Ciobanu L, Dumitrascu DL. Gastrointestinal Motility Disorders in Endocrine Disease. *Pol Arch Med Wewn*. 2011;121(4):129-36.
22. Almatier S. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama; 2002.
23. Muchtadi D. *Teknik Evaluasi Nilai Gizi Protein*. Bandung: Alfabeta; 2010.
24. Whitney E, Rolfes S. *Understanding Nutrition*. 9th edition. Belmont, CA: Thompson Wadsworth; 2005.
25. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods. Release 3.0. Nutrient Data Laboratory. 2011.
26. Haron H, Ismail A, Azlan A, Shahar S, Peng LS. Daidzein and Genestein Contents in

- Tempeh and Selected Soy Products. *Food Chemistry*. 2009; 115(4): 1350–6.
27. Pilsková L, Riečanský I, Jagla F. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. *Physiological Research*. 2010; 59(5): 651–64.
 28. Silverstein MG, Kaplan JR, Appt SE, Register TC, Shively CA. Effect of Soy Isoflavones on Thyroid Hormones in Intact and Ovariectomized Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). *Menopause*. 2014; 21(10): 1136–42.
 29. Utiger RD. *Endocrinology & Metabolism 4th ed*. New York: McGraw-Hill Inc; 2001.
 30. Modaresi M, Khorrami H, Asadi-Saman M. The Effect of Feeding with Soybean on Serum Level of TSH, T3 and T4 in Male Mice. *J Herb Med Pharmacol*. 2014; 3 (2): 93-6.
 31. Doerge DR, Sheehan DM. Goitrogenic and Estrogenic Activity of Soy Isoflavon. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 (suppl 3): 349-53.
 32. Civitelli R, Villareal RA, Napoli N. Bone Turnover Markers: Understanding Their Value in Clinical Trials and Clinical Practice. *Osteoporos Int*. 2009; 20: 843-51.
 33. Pirro M, Manfredelli MR, Scarponi AM, Lupatelli G, Bagaglia F, Melis F, et al. Association Between Thyroid Hormon Levels, The Number of Circulating Osteoprogeniter Cells and Bone Mineral Density in Euthyroid Postmenopausal Women. *Metabolism*. 2012; 61(4): 569-76.
 34. Zhang W, Zhang Y, Liu Y, Wang J, Gao L, Yu C et al. Thyroid Stimulating Hormon Maintains Bone Mass and Strength by Suppressing Osteoclast Differentiation. *J of Biomechanics*. 2014; 47: 1307-14.
 35. Lee WY, Oh KW, Rhee EJ, Jung CH, Kim SW, Yun Ej et al. Relationship Between Subclinical Thyroid Dysfunction and Femoral Neck Bone Mineral Density in Women. *Archives of Medical Research*. 2006; 237: 511-6.
 36. Ock SY, Chung YS, Choi YJ. Changes in Bone Mineral Density and Trabecular Bone Score in Grave's Disease Patients after Anti-thyroid Therapy. *Osteoporosis and Sarcopenia*. 2016; 2: 175-9.
 37. Wei P, Liu M, Chen Y, Chen DC. Systematic Review of Soy Isoflavone Supplements on Osteoporosis in Women. *Asian Pac J Trop Med*. 2012; 5 (3): 243-8.
 38. Taku K, Melby MK, Nishi N, Omon T, Kurzer MS. Soy Isoflavones for Osteoporosis: An Evidence-Based Approach. *Maturitas*. 2011; 70 (4): 333-8.
 39. Boskey AL. Mineral-matrix interaction in bone and cartilago. *Clin Orthop Relat Res*. 1992; (281): 244-74.
 40. Talbot JR, Guardo P, Seccia S, Gear L, Lubary DR, Saad G, et al. Calcium Bioavailability and Parathyroid Hormone Acute Changes after Oral Intake of Dairy and Nondairy Products in Healthy Volunteers. *Osteoporos Int*. 1999; 10 (2): 137-42.
 41. Norman J, Goodman A, Politz D. Calcium, Parathyroid Hormone and Vitamin D in Patients with Primary Hyperthyroidism: Normograms Developed from 10.000 Cases. *Endocrine Practice*. 2011; 17 (3): 384-94.
 42. Hirsch PF, Lester GE, Talmage RV. Calcitonin, an Enigmatic Hormone: Does it Have a Function?. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001; 1(4): 299-305.
 43. Iqbal AA, Burgess EH, Gallina DL, Nanes MS, Cook CB. Hypercalcemia in Hyperthyroidism: Patterns of Serum Calcium, Parathyroid Hormone, and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Levels During Management of Thyrotoxicosis. *Endocr Pract*. 2003; 9 (6): 517-21.

44. Tanberg A. The Relation Between the Thyroid and Parathyroid Glands. *JEM*.1916; 24(5): 547-59.
45. Chen H, Senda T, Emura S, Kubo K. An Update on The Structure of the Parathyroid Gland. *The Open Anatomy Journal*. 2013; (5): 1-9.
46. Feng Y, Zhou M, Zhang Q, Liu H, Xu Y, Shu L, et al. Synergistic Effects of High Dietary Calcium and Exogenous Parathyroid Hormone in Promoting Osteoblastic Bone Formation in Mice. *British J of Nut* 2015; 113(6): 909-22.
47. Aloia JF, Dhaliwal R, Shieh A, Mikhail M, Islam S, Yeh JK. Calcium and Vitamin D Supplementation in Postmenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98 (11): E1702–9.