

Pengaruh Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Histologi Ovarium Mencit (*Mus musculus* L) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral

Effect of Black Soybean (Glycine soja) Extract on Ovarian Histology of Swiss Webster Mice (Mus musculus L) Unilateral Ovariectomy

Mahriani*), Eva Tyas Utami, Nindita Fitria Primasari

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

*E-mail: yani_hendro@yahoo.com

ABSTRACT

Estrogen production can be reduced due to menopause and ovariectomy. Decreased estrogen levels in the body cause physiological changes in the female reproductive system. Therefore, the intake of estrogen from outside the body is needed, in this case phytoestrogens from soy bean extract can be used to replace the role of endogenous estrogen. The study used 30 Swiss Webster mice (*Mus musculus*) aged 90 days weighing 35 grams which were unilateral ovariectomy. Mice are ready to be used as test animals after an estrogen deficiency period of 60 days. Mice were divided into five groups: negative control, positive control, dose 0.21, 0.42, and 0.63 g/mL/day. Data obtained from the results of the study were analyzed using the One Way ANOVA test with a confidence level of 99% or $\alpha = 0.01$. Based on the results of the study, the administration of black soybean flour extract in unilateral ovariectomy mice can increase the average number of primordial follicles at doses of 0.42 g/ml/day and dosage 0.63 g/ml/day, primary follicles at a dose of 0.42 g/ml/day and doses of 0.63 g/ml/day, and secondary follicles at a dose of 0.63 g/ml/day, and tend to increase the average number of primordial follicles at doses of 0.21 g/ml/day, follicles primary at doses of 0.21 g/ml/day, secondary follicles at doses of 0.21 g/ml/day and 0.42 g/ml/day, de Graaf follicles at doses of 0.21, 0.42 and 0.63 g/ml/day.

Keywords: unilateral ovariectomy, phytoestrogen, ovary, black soybean.

PENDAHULUAN

Estrogen merupakan salah satu hormon yang berperan penting dalam sistem reproduksi betina. Estrogen berperan dalam merangsang perkembangan kelenjar mammae, merangsang siklus estrus dan persiapan uterus untuk implantasi (Hafez & Hafez, 2000). Salah satu peran estrogen tersebut adalah dalam pembentukan dan pematangan ovum atau folikulogenesis. Folikulogenesis merupakan proses yang panjang sebelum ovum akan diovolasikan. Folikel dalam masa perkembangannya tergantung pada peningkatan kadar estrogen, khususnya 17- β estradiol (Kolibanakis *et al.*, 2005). Jika terjadi kondisi penurunan kadar estrogen maka dapat berpengaruh terhadap proses pembentukan dan pematangan ovum tersebut.

Kadar estrogen dalam tubuh dapat berkurang akibat menopause dan ovariektomi. Penurunan kadar estrogen dalam tubuh menyebabkan perubahan fisiologis pada sistem reproduksi betina (Cassidy *et al.*, 1995) khususnya pada ovarium sebagai tempat terjadinya folikulogenesis. Oleh sebab itu,

diperlukan asupan hormon estrogen dari luar tubuh. Salah satu jenis estrogen dari luar tubuh dapat berupa fitoestrogen yang banyak dijumpai pada jenis kacang-kacangan. Fitoestrogen tersebut dapat dimanfaatkan untuk menggantikan peran estrogen yang diproduksi dari dalam tubuh. Mekanisme kerja fitoestrogen dalam jaringan adalah dengan berikatan pada reseptor estrogen (Markaverich *et al.*, 1995).

Fitoestrogen merupakan suatu senyawa fenolik yang berasal dari tumbuhan dan memiliki sifat estrogenik karena memiliki struktur menyerupai estrogen pada mamalia (Sirtori *et al.*, 2005). Dengan struktur yang menyerupai estrogen, fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogenik di dalam sel sehingga dapat bersifat estrogenik atau antiestrogenik (Hwang & Choi, 2015). Fitoestrogen dapat digolongkan menjadi isoflavon, stilbene, koumestan dan lignin (Moon *et al.*, 2006). Isoflavon merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang banyak dijumpai pada famili Leguminaceae antara lain pada kacang kedelai. Diantara jenis-jenis kacang kedelai, kedelai hitam memiliki

kandungan senyawa tanin, antosianin dan isoflavan serta memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding kedelai kuning (Xu & Chang, 2007). Kadar flavonoid total yang terkandung dalam kedelai hitam sebesar 1,78 mg RE/g sedangkan kadar flavonoid total yang terkandung pada kedelai kuning sebesar 0,57 mg RE /g (Ren *et al.*, 2011). Dengan kandungan flavonoid yang tinggi tersebut, kedelai hitam dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber fitoestrogen dari luar tubuh yang berpengaruh terhadap sistem reproduksi betina.

Salah satu organ reproduksi betina yang dapat dipengaruhi oleh fitoestrogen adalah ovarium. Ovarium berfungsi sebagai tempat terjadinya pematangan sel telur melalui proses folikulogenesis dan menghasilkan hormon reproduksi yaitu estrogen dan progesteron.

METODE

Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pembuatan preparat histologi ovarium dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri atas kandang mencit dan penutup dari ram kawat besi, timbangan analitik, jarum sonde lambung ujung tumpul, botol minum mencit, papan bedah, *sputit injection*, silet, ekskavator, jarum sutura, klem arteri, *needle holder*, pinset, gunting, *beaker glass*, botol *scott*, corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen, *rotary evaporator*, *waterbath*, *rotary microtome*, oven, botol reagen, mikroskop, optilab, *staining jar*, flakon, oven.

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri atas mencit (*Mus musculus*), pakan pellet Turbo, aquades steril, ketamine 10%, *xyla*, benang silk, benang *catgut*, sekam padi steril, serbuk gergaji kayu steril, *betadine*, alkohol 70%, antibiotik, cairan infus, kasa steril, *tissue*, *gloves*, masker, kedelai hitam, *chloroform*, larutan fiksatif PBS formalin, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut, pewarna Hematoxylin dan Eosin (HE), *xylol*, dan entelan.

Ovariektomi mencit

Ovariektomi adalah pengambilan ovarium melalui pembedahan. Prosedur ovariektomi dilakukan pada mencit betina yang dibius dengan ketamil 10% dan *xyla*. Selanjutnya dilakukan pembedahan secara perlahan hingga lapisan muskulus daerah abdomen terbuka. Semua bagian organ reproduksinya diambil untuk mencari ovarium kemudian dijepit dengan klem arteri dan diikat bagian ujung oviduk dengan silk. Salah satu ovarium dipotong dan arteri klem arteri dilepas. Organ yang telah dikeluarkan

direposisi kembali dalam abdomen dan diberi larutan *Sodium Chloride* 0,9 %.

Proses penutupan dilakukan pada bagian *muskulus* dengan cara dijahit menggunakan jarum sutura. Luka akibat pembedahan diolesi dengan betadin pada daerah insisi. Dilakukan injeksi antibiotik (*Levofloxacin*) pada mencit serta paracetamol selama 1 minggu (Strom *et al.*, 2012).

Pembuatan ekstrak tepung kedelai hitam

Biji kedelai hitam ditumbuk kemudian ditimbang dan dioven pada suhu 44-46°C selama tiga hari kemudian digiling dengan menggunakan grinder hingga menjadi tepung. Tepung kedelai hitam yang diperoleh diberi pelarut alkohol 70%. Larutan dihomogenkan dan dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat murni tanpa alkohol, kemudian filtrat dimasukkan dalam *waterbath* untuk mendapatkan filtrat murni dalam bentuk pasta.

Perlakuan hewan uji

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit betina strain Swiss Webster yang telah diovariektomi unilateral dan dipelihara selama 60 hari untuk masa defisiensi estrogen. Mencit kemudian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam. Kelompok kontrol terdiri atas kontrol negatif yaitu mencit tanpa ovariektomi unilateral dan tanpa ekstrak tepung kedelai hitam dan kontrol negatif yaitu mencit ovariektomi unilateral tanpa ekstrak tepung kedelai hitam. Sedangkan kelompok perlakuan yaitu mencit ovariektomi unilateral diberi ekstrak tepung kedelai hitam secara oral (*gavage*) dengan dosis 0,21 g/ml/hari, 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari selama 10 hari. Dosis ini diberikan berdasarkan hasil penelitian Lestari (2018) yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada masa implantasi mencit dengan dosis 0,31 mg/mL meningkatkan jumlah implantasi sedangkan pemberian ekstrak dengan dosis 0,63 mg/mL menurunkan jumlah implantasi.

Mencit dibedah pada hari ke-11 untuk pengambilan organ ovarium, dilanjutkan dengan pembuatan preparat ovarium sehingga dapat diamati, pengamatan meliputi jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf.

Pembuatan preparat histologi ovarium

Pengambilan sampel dilakukan dengan pembedahan pada bagian medial perut untuk mengambil organ ovarium. Selanjutnya metode yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi ovarium dengan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Metode parafin dilakukan dengan urutan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *infiltrasi*, *embedding*, *sectioning*, *affixing* dan *mounting* (Suntoro, 1983)

Parameter yang diamati

Parameter yang diamati adalah jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf menggunakan tiga kali pengulangan. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan optilab.

Analisis data

Data berupa rata-rata jumlah folikel primordial, primer, sekunder, dan de Graaf dianalisis menggunakan uji *One Way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 99 % atau $\alpha = 0,01$ kemudian dilanjutkan dengan Uji Duncan untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan (Steel & Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap jumlah folikel ovarium mencit strain Swiss Webster yang diovariectomi secara unilateral pasca pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Jumlah folikel ovarium yang diamati meliputi rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf.

Hasil penghitungan rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf pada mencit strain Swiss Webster ovariectomi unilateral setelah diberi perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil analisis *One Way Anova* pada folikel primordial diperoleh nilai signifikansi $p=0,000<0,01$ dan pada folikel primer diperoleh nilai signifikansi $p=0,000<0,01$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam berpengaruh terhadap rata-rata jumlah folikel primordial dan folikel primer mencit ovariectomi unilateral. Sedangkan pada folikel sekunder diperoleh nilai signifikansi $p=0,014>0,01$ dan pada folikel de Graaf diperoleh nilai signifikansi $p=0,034>0,01$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam tidak berpengaruh terhadap rata-rata jumlah folikel sekunder dan folikel de Graaf mencit ovariectomi unilateral.

Hasil uji Duncan terhadap rata-rata jumlah folikel primordial dan folikel primer pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif terdapat perbedaan yang signifikan, namun pada rata-rata jumlah folikel sekunder dan folikel de Graaf terdapat perbedaan yang tidak signifikan tetapi jumlahnya cenderung mengalami penurunan. Pada kelompok kontrol positif diduga terjadi defisiensi hormon estrogen akibat ovariectomi unilateral yang berpengaruh pada

folikel primordial dan folikel primer. Menurut Berkalani (2013), folikel primordial dapat berkurang jumlahnya karena mengalami degenerasi. Ovariectomi unilateral menyebabkan penurunan jumlah folikel primordial karena folikel primordial akan mengalami atresi lebih banyak sehingga hanya sedikit yang akan berkembang menjadi folikel primer (Meredith *et al.*, 1992). Penurunan jumlah folikel primer akan mengakibatkan penurunan jumlah folikel sekunder dan folikel de Graaf.

Estrogen merupakan salah satu hormon yang berperan penting dalam perkembangan folikel. Berdasarkan penelitian Findlay *et al.* (2009), mencit yang mengalami defisiensi estrogen maupun kerusakan reseptor estrogen akan mengalami hambatan dalam folikulogenesis, terutama pada perkembangan folikel sebelum matang. Dalam penelitian ini diketahui bahwa dengan adanya ovariectomi terjadi penurunan rata-rata jumlah folikel primordial dan folikel primer secara signifikan. Dengan demikian ovariectomi unilateral yang dilakukan diduga mengakibatkan penurunan kadar estrogen di dalam tubuh yang berakibat pada perkembangan folikel primordial dan folikel primer. Pada Tabel 1, tampak bahwa penurunan kadar estrogen akibat ovariectomi unilateral tidak berpengaruh secara signifikan pada folikel sekunder dan folikel de Graaf.

Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa pada penambahan ekstrak tepung kedelai dosis 0,21 g/ml/hari belum berpengaruh secara signifikan pada rata-rata jumlah folikel primordial, primer, sekunder dan de Graaf. Peningkatan dosis ekstrak tepung kedelai yang diberikan pada dosis 0,42 g/ml/hari mampu meningkatkan rata-rata jumlah folikel primordial dan primer dibandingkan K^+ namun tidak berbeda nyata dengan pemberian ekstrak tepung kedelai pada dosis 0,21 g/ml/hari. Peningkatan dosis ekstrak yang diberikan tersebut juga tidak berbeda nyata terhadap rata-rata jumlah folikel sekunder dan de Graaf. Pemberian ekstrak tepung kedelai dosis 0,63 g/ml/hari mampu meningkatkan rata-rata jumlah folikel primordial, primer, sekunder dan de Graaf. Namun demikian peningkatan dosis yang diberikan tersebut tidak berpengaruh secara signifikan dibandingkan pemberian ekstrak tepung kedelai dosis 0,42 g/ml/hari pada folikel primordial dan folikel primer. Bahkan pada folikel sekunder dan folikel de Graaf, pemberian ekstrak pada dosis tertinggi tersebut tidak signifikan dengan pemberian

ekstrak tepung kedelai pada dosis 0,21 mg/ml/hari.

Peningkatan rata-rata jumlah folikel pada penelitian ini diduga karena adanya pemberian ekstrak kedelai hitam. Kedelai hitam mengandung isoflavon yang strukturnya mirip dengan estrogen endogen sehingga menyebabkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Mazur *et al.*, 1998). Peningkatan rata-rata jumlah folikel primer disebabkan karena adanya senyawa fitoestrogen dalam ekstrak tepung kedelai hitam yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen endogen dalam ovarium (Couse & Korach, 1999). Estrogen berperan meningkatkan ekspresi reseptor FSH sehingga FSH akan berikatan dengan reseptor untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel (Rul *et al.*, 2016). Menurut Dewatiningrum (2008), hormon estrogen berperan dalam meningkatkan jumlah reseptor FSH pada sel-sel granulosa sehingga folikel ovarium mengalami perkembangan.

Pemberian dosis ekstrak tertinggi tidak berpengaruh signifikan terhadap rata-rata jumlah folikel primordial, primer, sekunder, dan de Graaf dibandingkan dengan pemberian ekstrak dosis 0,42 g/ml/hari. Hal ini diduga

karena pengaruh fitoestrogen dalam menimbulkan aksi estrogenik membutuhkan ketepatan dosis pemberian.

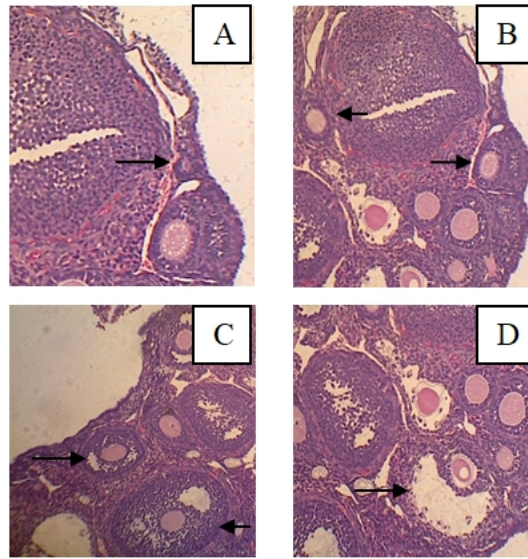
Menurut Berkalani (2013), fitoestrogen bekerja dengan cara berikatan pada reseptor estrogen dan akan menyebabkan timbulnya aktivitas estrogenik. Ketika supply estrogen dalam tubuh menurun, dan banyak reseptor estrogen tersedia maka adanya senyawa fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen tersebut meskipun afinitasnya rendah. Pada perkembangan folikel, fitoestrogen memiliki kemampuan dalam menekan perkembangan folikel, sehingga folikel tetap berada pada tahap primer dan tidak berkembang menjadi folikel pada tahap selanjutnya (Mardiati & Sitaswi, 2008).

Menurut Markaverich *et al.* (1995), mekanisme kerja fitoestrogen dalam jaringan adalah dengan berikatan dengan reseptor estrogen. Namun fitoestrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen memiliki afinitas lebih rendah daripada estrogen endogen sehingga menyebabkan gangguan pada sistem neuroendokrin. Selanjutnya gangguan pada sistem neuroendokrin tersebut menyebabkan tertekannya perkembangan folikel ovarium.

Tabel 1 Rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf mencit strain Swiss Webster ovariektomi unilateral setelah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam

Perlakuan (g/ml/hari)	$\bar{x} \sum$ folikel primordial ($\bar{x} \pm SD$)	$\bar{x} \sum$ folikel primer ($\bar{x} \pm SD$)	$\bar{x} \sum$ folikel sekunder ($\bar{x} \pm SD$)	$\bar{x} \sum$ folikel de Graaf ($\bar{x} \pm SD$)
K-	15,00±1,00 ^c	15,00±1,00 ^c	5,00±1,00 ^{ab}	2,66±0,76 ^a
K+	7,00±1,00 ^a	4,00±1,00 ^a	1,00±1,00 ^a	0,83±0,76 ^a
0,21	10,33±2,51 ^{ab}	6,66±1,32 ^{ab}	1,83±0,76 ^{ab}	1,00±0,50 ^a
0,42	14,00±1,00 ^{bc}	10,0±2,64 ^{bc}	1,83±0,76 ^{ab}	1,16±0,76 ^a
0,63	17,33±2,08 ^c	15,0±3,00 ^c	5,16±2,75 ^b	2,00±0,50 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda sangat nyata antar dosis perlakuan ($p < 0,01$). K-; mencit tanpa ovariektomi, tanpa pemberian ekstrak tepung kedelai. K+: mencit ovariektomi, tanpa pemberian ekstrak tepung kedelai



Gambar 1. Struktur histologi folikel primordial (A), folikel primer (B), folikel sekunder (C) dan folikel de Graaf (D) setelah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 400x

Whitten dan Patisaul (2001) membuktikan bahwa isoflavon dan lignan merupakan inhibitor bagi 5α -reduktase dan aromatase. Enzim 5α -reduktase berperan dalam proses sintesis testosteron, sedang aromatase merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan estron dari androstenedion. Isoflavon yang menghambat aromatase untuk membentuk estron akan menyebabkan tidak terbentuknya hasil akhir berupa estradiol 17β sehingga menekan perkembangan folikel ovarium, selain itu isoflavon mempengaruhi ketersediaan estrogen dengan menghambat 17β hidroksisteroid dehidrogenase I yang juga berperan dalam pembentukan estrogen. Penghambatan dalam pembentukan estrogen akan menyebabkan perkembangan folikel ovarium terhambat.

Hasil uji Duncan terhadap rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf menunjukkan bahwa pada perlakuan antar dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 mengalami peningkatan. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin meningkat jumlah rata-rata folikel. Menurut Mardianti & Sitasiwi (2008), korelasi antara jumlah folikel dengan konsentrasi estrogen ternyata terdapat korelasi positif yaitu semakin tinggi konsentrasi estrogen semakin meningkat rata-rata jumlah folikel. Struktur histologi folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf pada pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dapat dilihat pada Gambar 1. Pada

struktur histologi ovarium tidak dijumpai kerusakan struktur jaringan ovarium maupun struktur pada folikel primordial, primer, sekunder, maupun folikel de Graaf akibat ovariectomi unilateral maupun pemberian ekstrak tepung kedelai hitam.

KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada mencit ovariectomi unilateral meningkatkan rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, namun tidak berpengaruh terhadap rata-rata jumlah folikel sekunder dan folikel de Graaf.

DAFTAR PUSTAKA

- Berkalani YK. 2013. *Pengaruh Pemberian Infusa Biji Adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Produktif Dan Premenopause*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Cassidy A, Bingham S & Setchell K. 1995. Biological Effects of Isoflavones In Young Women: Importance of The Chemical Composition of Soyabean Products. *British Journal of Nutrition*. **74**: 587-601.
- Couse JK & Korach KS.1999. Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocrine Review*. **20**(3): 358-417.

- Dewantiningrum, J. 2008. Perbedaan Pengaruh Clomiphene Citrate dan Letozole Terhadap Folikel, Endometrium dan Lendir Serviks. *Tesis*. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis I Universitas Diponegoro.
- Findlay JK, Kerr JB, Britt K, Liew SH, Simpson ER, Rosairo D & Drummond A. 2009. Ovarian Physiology: Follicle Development, Oocyte and Hormone Relationship. *Anim. Reprod.* **6**(1): 10-19.
- Hafez, B. & Hafez, E. 2000. *Reproduction in Farm Animal 7th Edition*. USA. Lippincott William & Wilkins : Baltimore.
- Hwang KA & Choi. 2015. Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenicity Posing the Risk of Cancer Progression in Estrogen-Responsives Organ. *Advances in Molecular Toxicology.* **9**.
- Kolbianakis EM, Papanikolau EG, Fatemi HM & Devroy P. 2005. Estrogen and Folliculogenesis: Is One Necessary for The Other? *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* **17**: 249-253.
- Lestari DW. 2018. Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Implantasi Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C Pasca Ovariektomi Unilateral. Skripsi. Program Studi S1-Biologi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember.
- Mardianti SM & Sitaswi AJ. 2008. Korelasi Jumlah Folikel Ovarium dengan Konsentrasi Hormon Estrogen Mencit (*Mus musculus*) setelah Konsumsi Harian Tepung Kedelai selama 40 Hari. *Buletin Anatomi dan Fisiologi.* **XVI**(2).
- Markaverich BM, Webb B, Densmore CL & Gregory RR. 1995. Effect of Coumestrol on Estrogen Reseptor Function and Uterin Growth in Ovarietomized Rats. *Environ Health Perspect*, **103**(6): 574-581.
- Mazur WM, Duke JA, Wahala K, Rasku S & Adlercretutz H. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritiol and Health Aspect in Humans. *Research Communications.* **9**: 193-200.
- Meredith S, Dudenhorffer G, Butcher RL, Lener S P & Walls T. 1992. Unilateral Ovariectomy Increases Loss of Primordial Follicles and is Associated with Increased Metestrus Concentration of Follicles Stimulating Hormone in Old Rats. *Biology of Reproduction.* **47**: 162-168.
- Moon YJ, X Wang & Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: Effects of Xenobiotic and Carcinogen Metabolism. *Toxicol. In Vitro.* **20**: 187-210.
- Ren S-C, Liu ZL & Wan, P. 2011. Proximate Composition and Flavonoids Content and In Vitro Antioxidant Activity of 10 Varieties of Legume Seeds Grown in China. *Journal of Medicinal Plants Research.* **6**(2): 301-308.
- Rul AS, Soejono SK, Meiyanto E & Wahyuningsih MSH. 2016. Efek Kurkumin Terhadap Estradiol dan Ekspresi Reseptor Estrogen β Kultur Sel Granulosa Babi Folikel Sedang. *Jurnal Kedokteran Brawijaya.* **29**(1): 32-38.
- Sirtori CR, Arnoldi A & Johnson. 2005. Phytoestrogens: End of a Tale?. *Ann.Med.* **37**: 423-438.
- Strom JO, Theodorsson A, Ingberg E, Isaksson IM & Theodorsson E.2012. Ovariectomy and 17 β -estradiol Replacement in Rats and Mice: a Visual Demonstration. *Journal of Visualized Experiments.* **64**: 1-4.
- Whitten PL & Pattisaul HB. 2001. *Cross-species dan interassay Comparison of Phytoestrogen Action. Environmental Health Perspectives Supplements.* **109**. Departmen Anthropology and Center for Behavioural Neuroscience Emory University. Atlanta. Georgia USA.
- Xu BJ & Chang SKS. 2007. A Comparative Study on Phenolic Profils and Antioxidant of Legums as Affected by Extraction Solvents. *J. Food Sci.* **72**(2): 159-166.