

Tepung Tempe Kaya Isoflavon Meningkatkan Kadar Kalsium, Posfor dan Estrogen Plasma Tikus Betina Normal

(ISOFLAVON-RICHED TEMPE FLOUR INCREASED THE PLASMA LEVEL OF CALCIUM, PHOSPHOR, AND ESTROGEN OF NORMAL FEMALE RATS)

I Nyoman Suarsana¹, I Nyoman Sadra Dharmawan², I Wayan Gorda³, Bambang Pontjo Priosoeryanto⁴

¹Laboratorium Biokimia, ²Laboratorium Patologi Klinik, ³Laboratorium Bedah, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jln. Sudirman Denpasar Bali. E-mail : suarsana65@yahoo.com
⁴Laboratorium Patologi, Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi
FKH Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian tepung tempe kaya isoflavon terhadap kadar kalsium, posfor dan estrogen plasma tikus betina pada masa pertumbuhan. Penelitian ini menggunakan 50 ekor tikus betina galur Sprague Dawley umur 2 bulan dengan rata-rata bobot badan 200 g. Tikus percobaan dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (K0), yaitu tikus normal tanpa diberi perlakuan dan kelompok yang diberi tepung tempe kaya isoflavon (K1, K2, K3, K4), yaitu perlakuan dengan pemberian isoflavon masing-masing dosis 1, 2, 4, dan 6 mg/200 g / bb per oral. Perlakuan dilakukan selama 2 bulan. Pada akhir penelitian, plasma darah diambil untuk analisis kadar kalsium, fosfor dan estrogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar kalsium, fosfor dan hormon estrogen plasma lebih tinggi pada kelompok tikus betina yang diberi tepung tempe kaya isoflavon dibandingkan dengan kelompok kontrol, meskipun tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Pemberian tepung tempe dengan kadar isoflavon 4 mg/200 g bb/hari memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan kadar kalsium, posfor dan estrogen plasma tikus dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Kata-kata kunci: Tepung tempe, isoflavon, kalsium, posfor, estrogen.

ABSTRACT

This research aimed to study the effect of isoflavon-riched tempe flour on calcium (Ca, phosphate (P), and estrogen levels in plasma et normal female rats during their growth period. A level of twenty-five 2 months old female Sprague Dawley rats with an average body weight of 200 g was randomly divided into into 5 groups: one with control group (K0: without treatment) and four treatment groups (K₁, K₂, K₃, K₄: animals were given tempe flour with isoflavon at 1; 2; 4; and 6 mg/200 g/bw, respectively). The treatment was conducted for two months, following this blood plasma was collected to analyse the level of calcium, phosphor, and estrogen, respectively. The result showed that although the plasma level of Ca, P, and estrogen was higher in the treatment group compare to the control group, this was not significantly different ($P>0,05$). The highest plasma level of Ca, P, and estrogen was seen in animal receiving tempe flour with 4 mg/200 g bw/day isoflavon.

Keyword: Tempe flour, isoflavon, calcium, phosphor, estrogen.

PENDAHULUAN

Banyak unsur makromineral seperti kalsium dan fosfor diketahui esensial untuk hidup, kesehatan, dan penting untuk pertumbuhan tulang. Kalsium dan fosfor adalah unsur makromineral yang paling banyak terdapat di semua jaringan tubuh dan terlibat dalam sejumlah besar proses biologi dan metabolisme tubuh yang penting (Linder, 1992).

Kalsium plasma berada dalam tiga bentuk, yaitu berikatan dengan protein terutama albumin, kompleks dengan ligan berukuran kecil (posfat, sitrat, dan sulfat), dan kalsium terionisasi (Ca^{2+}). Sekitar 99% kalsium tubuh ditemukan pada tulang dan gigi dalam bentuk garam kalsium posfat dan sekitar 1% ditemukan dalam cairan ekstrasel. Sedangkan fosfor sekitar 85% berada dalam tulang dan gigi dan dalam cairan ekstrasel sekitar 0,1%. Fosfor plasma kebanyakan ditemukan sebagai ion posfat anorganik (HPO_4^{2-} dan HPO_4^-) dengan hanya 10% yang terikat dengan protein dan sisanya berdifusi secara bebas dan dalam keseimbangan dengan fosfor tulang dan intrasel (Wilson, 2005)

Sehubungan dengan fungsi mineral tersebut dalam pembentukan tulang, menurut Sikikawiyana (2010), laju pembentukan tulang oleh sel osteoblas dipengaruhi oleh faktor ketersediaan kalsium, fosfor, kalsitriol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$), BMP (*bone morphogenic protein*) dan hormon estrogen. Hormon estrogen berkaitan dengan resorpsi tulang. Kekurangan estrogen berpengaruh terhadap penurunan kadar hormon paratiroid (PTH) dan akan meningkatkan resorpsi tulang, sehingga terjadi penurunan massa tulang dan mempercepat proses kerapuhan tulang.

Tempe merupakan bahan pangan sumber mineral. Kandungan mineral kalsium dan fosfor per 100 g tempe masing-masing 347 dan 724 mg (Hermana et al., 1996). Kandungan kalsium dan fosfor yang tinggi dalam tempe akan meningkatkan ketersediaan kedua mineral tersebut bagi tubuh dan sangat bermanfaat dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tulang. Selain sebagai sumber gizi, tempe juga sumber senyawa bioaktif. Sebagai sumber senyawa bioaktif, tempe diketahui mengandung senyawa isoflavon dalam bentuk aglikon dan glukosida. Senyawa isoflavon aglikon di antaranya daidzein, genistein, dan glisitein (Nakajima et al., 2005), serta soflavon faktor-2 (6,7,4-trihidroksi isoflavon) (Pokorny, 2001).

Isoflavon tempe merupakan salah satu senyawa alami yang memiliki sifat seperti estrogen (*like estrogen*). Kemiripan struktur molekul isoflavon tempe dengan estrogen endogen, menyebabkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE), khususnya reseptor β -RE, yang terdapat pada berbagai sel dalam tubuh (Ruggiero et al., 2002). Kemampuan isoflavon berikatan dengan reseptor β -RE dan kemudian menginduksi gen, diharapkan dapat meningkatkan hormon estrogen.

Tepung tempe kaya isoflavon yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dengan tujuan untuk menyediakan kandungan isoflavon yang tinggi serta kandungan kalsium dan fosfor. Kandungan isoflavon dan kedua mineral tersebut diharapkan dapat meningkatkan kadar estrogen dan kadar mineral kalsium dan fosfor dalam plasma tikus dalam pertumbuhan normal. Nantinya diharapkan, efek positif yang terjadi pada tikus masa pertumbuhan normal dapat diaplikasikan untuk mencegah kasus-kasus kerapuhan tulang seperti osteoporosis.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung tempe kaya isoflavon terhadap kadar kalsium, fosfor dan estrogen plasma tikus betina normal pada masa pertumbuhan.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus percobaan galur *Sprague Dawley*, jenis kelamin betina, umur 2 bulan dengan kisaran bobot badan ± 200 g. Tepung tempe kaya isoflavon yang digunakan dibuat dengan cara menghilangkan lemak pada tepung tempe dan telah dianalisis kandungan isoflavonnya, serta telah diketahui mengandung isoflavon kadar tinggi.

Analisis Ca dan P Tepung Tempe Kaya Isoflavon

Analisis kandungan mineral Ca, dan P pada tepung tempe dilakukan dengan uji proksimat berdasarkan metode AOAC (1990).

Hewan Percobaan dan Pengambilan Sampel

Sebanyak 50 ekor tikus diadaptasikan selama 2 minggu dalam kondisi laboratorium,

kemudian tikus percobaan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (K0), yaitu tikus normal dan tidak diberi tepung tempe kaya isoflavon, kelompok yang diberi tepung tempe kaya isoflavon (K1; K2; K3; dan K4), yaitu tikus normal dan diberi tepung tempe kaya isoflavon dengan dosis isoflavon masing-masing diberikan 1 mg; 2 mg, 4 mg, dan 6 mg isoflavon/200g bb/hari secara oral menggunakan sonde lambung sebanyak 1 ml. Pemberian tepung tempe kaya isoflavon dilakukan selama 2 bulan. Setiap bulan selama 2 bulan semua kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor diambil plasma darah untuk analisis kadar kalsium dan posfor sedangkan estrogen di analisis pada akhir perlakuan. Sampel darah dikoleksi dari tikus melalui jantung kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi *ethylene diamine tetra acetic*/EDTA.

Analisis Kadar Kalsium Plasma

Sebanyak 0,1 ml sampel plasma ditambahkan dengan 5000 µg/ml potasium sampai volume larutan menjadi 5 ml. Larutan kemudian dipipet dan disemprotkan ke alat spektrofotometer serapan atom (SSA) untuk dibaca konsentrasi sampel tersebut. Kadar kalsium didapat dengan memasukkan hasil absorbansi sampel pada persamaan regresi linier standar yang didapat dari data standar kalsium. Larutan standar kalsium dibuat konsentrasi 0, 1, 2, 3 dan 4 µg/ml Ca dan masing-masing konsentrasi mengandung 5000 µg/ml potasium (Na).

Analisis Kadar Posfor Plasma

Sampel plasma dipipet sebanyak 0,2 ml ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah aquadest sebanyak 1 ml lalu ditambah 2,5 ml larutan *trichloroacetic acid* (TCA) 17%. Larutan sampel divortex (dihomogenkan), dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Filtrat yang dihasilkan dipipet sebanyak 3 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah larutan A sebanyak 2 ml. Larutan A terdiri atas 10 g ammonium molibdat ditambah 60 ml aquadest, kemudian ditambah 28 ml H₂SO₄ 96-98% dan 5 g FeSO₄.7H₂O dan dijadikan 100 ml dengan aquadest. Lalu dibaca (5 menit-2 jam) pada spektrofotometer UV-Vis LW 200 series dengan panjang gelombang 660 nm. Hal yang sama

dilakukan pula pada larutan standar posfor dengan konsentrasi mulai 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dan blanko.

Analisis Hormon Estrogen

Pengukuran kadar estrogen plasma dilakukan dengan metode *competitive coated-Acount estrogen radio immuno assay* (RIA) (The Lincol Research 2001, DPC, 2003). Ke dalam setiap tabung yang dilapisi dengan antibodi antiestrogen ditambahkan 200 µl sampel plasma, estrogen kontrol, dan kontrol negatif. Selanjutnya ditambahkan ¹²⁵I-estrogen, dihomogenisasi dengan *vortex mixer* dan diinkubasi pada suhu 15-28°C selama 18-24 jam. Kemudian semua reagen dibuang secara hati-hati dengan segera. Residu ¹²⁵I-estrogen tersisa dibaca dengan *gamma counter* selama satu menit. Makin sedikit kadar estrogen dalam plasma, maka semakin banyak residu ¹²⁵I-estrogen yang tersisa dalam tabung. Kadar estrogen ditentukan dengan memplot hasil pembacaan pada *gamma counter* dan membandingkannya dengan estrogen standar.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA). Jika perlakuan memberikan pengaruh yang nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan uji beda Duncan pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1993) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Kalsium dan Posfor Tepung Tempe Kaya Isoflavon

Hasil analisis kandungan kalsium dan posfor, pada tepung tempe disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisis kandungan mineral Ca, dan P pada tepung tempe rendah lemak kaya isoflavon

Komponen	Tepung tempe (mg/100 g bk)
Kalsium (Ca)	311,51 ± 23,42
Fosfor (P)	643,57 ± 33,53

Keterangan : bk = bahan kering

Pada Tabel 1 ditunjukkan bahwa tepung tempe rendah lemak merupakan sumber mineral, yang apabila diberikan pada tikus normal masa pertumbuhan dapat digunakan sebagai sumber mineral Ca dan P. Kedua mineral tersebut dapat digunakan untuk menjaga homeostasis Ca dan P dalam plasma selama pertumbuhan dan pemeliharaan tulang. Kandungan mineral Ca dan P pada tepung tempe rendah lemak cukup tinggi, sehingga selain penting pada masa pertumbuhan juga sangat diperlukan pada kasus-kasus kerapuhan tulang seperti pada kasus osteoporosis.

Menurut Hermana *et al.* (1996), konsumsi tempe secara teratur menghindarkan seseorang dari anemia akibat kekurangan zat gizi besi, serta terbebas dari osteoporosis akibat kekurangan kalsium dan posfor.

Kadar Kalsium dan Posfor pada plasma

Hasil analisis kadar kalsium dan posfor plasma darah tikus selama percobaan disajikan pada Tabel 2.

Pada tikus perlakuan tepung tempe, kadar kalsium plasma lebih tinggi meskipun tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kenaikan kadar kalsium plasma darah paling tinggi selama masa pemberian tepung tempe terjadi pada kelompok K3, kemudian disusul dengan perlakuan K2 dan K4 (Tabel 2).

Meningkatnya kadar kalsium pada perlakuan K3, disebabkan tepung tempe yang diberikan pada tikus percobaan mengandung mineral kalsium yang cukup tinggi. Hasil analisis kadar kalsium yang terdapat pada tepung tempe adalah sebesar 311,51 mg/100 g bahan kering/bk (Tabel 1). Dengan demikian, tepung tempe yang diberikan akan

meningkatkan ketersediaan kalsium bagi tubuh. Kadar kalsium dalam plasma darah akan dipertahankan oleh mekanisme homeostasis tubuh (Guyton dan Hall 1997). Kalsium yang terdapat dalam darah selanjutnya dideposit ke dalam tulang dan digunakan oleh jaringan tubuh lainnya dan kelebihan kalsium dikeluarkan melalui ginjal. Menurut Linder (1992), kalsium dan posfor merupakan mineral utama dan terbanyak dalam tubuh manusia dan hewan, serta paling banyak ditemukan pada tulang. Sembilan puluh sembilan persen berada pada tulang dalam bentuk hidroksilapatit $[Ca_3(PO_4)_2Ca(OH)_2]$.

Hal yang serupa dengan kadar kalsium juga terjadi pada kadar posfor. Pemberian tepung tempe dapat meningkatkan kadar posfor lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, walaupun tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Hal tersebut dapat dimengerti karena tepung tempe yang diberikan mengandung kadar posfor yang cukup tinggi, yaitu sebesar 643,57 mg/100 g bk (Tabel 1). Dengan demikian, pemberian tepung tempe rendah lemak memberi kontribusi dan berperan dalam peningkatan kadar posfor serta mengoptimalkan kadar posfor dalam plasma darah. Seperti halnya kadar kalsium, kadar posfor dalam plasma darah juga dipertahankan pada kondisi kadar optimum. Baik kalsium maupun posfor diregulasi oleh kebutuhan tubuh akan kedua mineral tersebut dengan melibatkan peran hormon, seperti hormon paratiroid dan kalsitonin (Granner, 2006)

Hasil analisis kadar kalsium dan posfor plasma (Tabel 2), juga terlihat bahwa kedua mineral tersebut berada dalam perbandingan yang optimum untuk kebutuhan tubuh. Perbandingan kalsium dan posfor (Ca:P) pada semua perlakuan adalah mendekati 1,5 : 1.

Tabel 2. Kadar kalsium dan fosfor plasma tikus selama 2 bulan percobaan

Perlakuan	Kadar Kalsium dan fosfor plasma (mg/dl)			
	Bulan ke 1		Bulan ke 2	
	Kalsium-1	Fosfor-1	Kalsium-2	Fosfor-2
K0	11,09±0,38 ^a	7,28±0,47 ^a	11,17±0,50 ^a	7,33±0,28 ^a
K1	11,10±0,37 ^a	7,34±0,46 ^a	11,29±0,47 ^a	7,47±0,46 ^a
K2	11,37±0,47 ^a	7,46±0,47 ^a	11,42±0,52 ^a	7,39±0,42 ^a
K3	11,53±0,51 ^a	7,62±0,40 ^a	11,64±0,54 ^a	7,74±0,39 ^a
K4	11,50±0,56 ^a	7,55±0,37 ^a	11,61±0,55 ^a	7,81±0,42 ^a

K0=kontrol (tikus normal), K1-K4 adalah kelompok tikus normal yang diberi isoflavon (ISF) masing-masing diberi 1; 2; 4 dan 6 mg/200g bb/hari

Tabel 3. Hasil analisis kadar hormon estrogen tikus setelah 2 bulan perlakuan

Perlakuan	Kadar hormon estrogen (mikro IU/ml)
K0	1,33±0,15 ^a
K1	1,32±0,12 ^a
K2	1,34±0,13 ^a
K3	1,40±0,12 ^a
K4	1,39±0,11 ^a

K0=tikus kontrol (tikus normal), K1-K4 adalah kelompok tikus normal yang diberi isoflavon (ISF) masing-masing diberi 1; 2; 4 dan 6 mg/200g bb/hari.

Tampaknya, nilai perbandingan tersebut dipertahankan oleh tubuh tikus selama percobaan, yang dapat memberikan hasil metabolisme tubuh yang optimum untuk pertumbuhan, khususnya pertumbuhan dan pemeliharaan tulang.

Kadar Estrogen Plasma

Hasil analisis hormon estrogen tikus setelah 2 bulan perlakuan disajikan pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kadar hormon antar kelompok kontrol dengan perlakuan tepung tempe kaya isoflavon. Namun demikian, pada pemberian tepung tempe dengan dosis isoflavon sebesar 4 mg/200g bb/hari terjadi kenaikan kadar estrogen lebih tinggi, tetapi tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan kelompok lainnya (P>0,05).

Beberapa peneliti melaporkan pemberian isoflavon tidak serta merta menaikkan kadar hormon estrogen atau tidak berpengaruh nyata terhadap kenaikan kadar hormon estrogen. Winarsi *et al.*, (2004), melaporkan bahwa kadar estrogen pada wanita *premenopause* yang diberi suplementasi isoflavon selama 2 bulan tidak berbeda nyata. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Persky (2002) pemberian isoflavon tidak menunjukkan perubahan yang nyata pada hormon estrogen endogen.

Isoflavon memiliki kemiripan dengan struktur estrogen, oleh sebab itu isoflavon disebut sebagai *estrogen like*. Adanya kemiripan struktur antara kedua senyawa tersebut, maka isoflavon mampu berikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat dalam sel berbagai

jaringan tubuh. Seperti yang dilaporkan oleh Kuiper *et al.*, (1998) dan Warner *et al.*, (1999), di dalam tubuh terdapat 2 macam reseptor estrogen, yaitu reseptor estrogen beta dan reseptor estrogen alpha. Kedua reseptor tersebut memainkan peranan yang berbeda, demikian pula terdistribusinya ke dalam jaringan dan *afinitas binding*. Reseptor estrogen beta terdistribusi dalam jaringan otak, tulang, kandung kemih dan epitel pembuluh darah, sedangkan reseptor estrogen alpha terdistribusi dalam jaringan uterus, payudara, hati, dan ginjal.

Berdasarkan hasil pengamatan, terjadi kenaikan kadar estrogen pada perlakuan dengan pemberian tepung tempe kaya isoflavon, meskipun tidak berbeda nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa isoflavon memiliki kemampuan untuk meningkatkan hormon estrogen. Menurut Marito (2001), isoflavon dapat berikatan dengan reseptor beta estrogen. Interaksi antara isoflavon daidzein dengan reseptor beta estrogen lebih kuat dibandingkan dengan reseptor alpha estrogen. Diduga kemampuan yang dimiliki oleh isoflavon untuk menginduksi gen dapat meningkatkan kadar hormon estrogen.

Peran estrogen pada pembentukan tulang adalah menurunkan resorpsi tulang. Pada saat kadar estrogen mulai menurun, maka estrogen sangat dibutuhkan untuk pembentukan dan pemeliharaan masa tulang. Fungsi tersebut diharapkan dapat digantikan oleh kerja isoflavon, sehingga kejadian dan gejala osteoporosis dapat dicegah.

SIMPULAN

Pemberian tepung tempe kaya isoflavon pada tikus percobaan meningkatkan kadar kalsium dan posfor plasma tikus betina normal, serta kadar estrogen.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian tepung tempe kaya isoflavon terhadap kemampuannya dalam pencegahan osteoporosis pada tikus sebagai hewan model.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, ucapan terimakasih disampaikan kepada DP2M Dikti atas dana penelitian Hibah Kompetensi yang dibiayai dari dana DIPA Dikti Nomor: 0041/023-04.1/-/2010, tanggal 31 Desember 2009, Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Tahun Anggaran 2010, Nomor : 2510/H14/HM/2010, atas nama I Nyoman Suarsana

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists. Edited Kenneth Helrich fifteenth. Published by the AOAC inc suite 400, 2200 Wilson Boulevard Arlington, Virginia, USA.
- DPC. 2003. Coat-A-Count estrogen. DPC. Diagnostic product corporation. Los Angeles, USA.
- Granner DK. 2006. Hormon yang Mengatur Metabolisme Kalsium. Di dalam Biokimia Harper. Editor Murray RK, Granner, DK, Mayes PA dan Rodwell VW. Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta. Halaman 539-546.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Fisiologi Kedokteran*. Penerjemah: Setiawan I, Tengadi, LMA KA, Santoso A. Jakarta. EGC.
- Hermana, Karmini M, Karyadi D. 1996. Komposisi dan nilai gizi tempe serta manfaatnya dalam peningkatan mutu gizi makanan. Di dalam Sapuan, Soetrisno N, Editor. *Bunga Rampai Tempe Indonesia*. Jakarta. Yayasan Tempe Indonesia. Halaman: 61-67
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B. 1998. Interaction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*. 139:4252-4263.
- Linder MC. 1992. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme: dengan pemakain secara klinis*. (Penterjemah Aminudin Parakkasi). Jakarta. Penerbit Universitas Indonesia. Halaman 253-255
- Morito K. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α dan β . *Biol Pharm Bull*. 24:351-356.
- Nakajima N, Nozki N, Ishihara K. 2005. Analysis Isoflavone content in tempeh, a fermented soybean and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. *J Biosci Bioeng* 100:685-687.
- Persky VW. 2002. Effect of soy protein on endogenous hormones in postmenopausal women. *Am. J Clin Nutr*. 75(1):145-153.
- Pokorny J, Yanihlieva N, Gordon M. 2001. *Antioxidants in Food*. Cambridge. CRC press. Woodhead publishing limited. P 380.
- Ruggiero RJ, Pham D, Frances EL. 2002. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J. Midwifery and Womens Health*. 47(3):130-138.
- Sikikawiyana K. 2010. Mendambakan Tulang Tetap Kuat Sehat dan Kuta di Hari Tua Melalui Pemahaman Osteoporosis dan Penanggulangannya. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besa Tetap dalam Bidang Ilmu Bedah Pada Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Sabtu 20 Maret 2010. 44 halaman.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, suatu pendekatan biometrik*. Jakarta. PT. Gramedia Pustaka Utama,
- The Linco Research. 2001. Estrogen RIA Kit, 250 tubes (Cat#RI-13K). The LincoResearch Inc.
- Warner M, Nilson S, Gustafsson JA. 1999. The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 11:249-254.
- Wilson LM 2005. Gangguan volume, osmolalitas, dan elektrolit cairan. Di dalam: Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit. Oleh Price SA dan Wilson LM. Edisi 6. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Hal 328-373
- Winarsi H, Muchtadi D, Zakaria FR, Purwantara B. 2004. Respon hormonal imunitas wanita premenopause yang diintervensi minuman fungsional berbasis susu skim yang disuplementasi dengan 100 mg isoflavon kedelai dan 8 mg za-sulfat. *Jurnal Teknol Industri Pangan*. 15(1):28-34.