

Efek Paparan Tepung Kedelai dan Tepung Tempe sebagai Sumber Fitoestrogen terhadap Jumlah Kelenjar Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus L.*)

Agung Janika Sitasawi*

**Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan BiologiF, MIPA UNDIP*

Abstract

Phytoestrogen has been known have many advantages in human health. It has estrogenic effect because it similarity in structure with natural estrogen. It action done by interact with estrogen receptor and inhibit the interaction of natural estrogen. The aim of this research was to evaluate the effect of soybean starch as phytoestrogen resources on reproduction of *M. musculus*, by the endometrial thickness and the sum of endometrial glands aspects. The adult female Swiss Webster mice were used as animal treatment. The mice were treated with 0,975 mg/kg BW/day of soybean starch and 0,148g/kgBW/day. Uterine samples collected from every estrous phase made as histological slides with paraffin methods and stained with H.E. with 6 μ in thickness. Anova with factorial design at 5% significances were used to analyzed the data. This search showed that there was no significances between control and treatment group so it can be concluded that the result were caused by the act of endogen estrogen in animal treatment.

Key words : Endometrial glands, M. musculus L., Phytoestrogen

Abstrak

Fitoestrogen telah diketahui memiliki manfaat bagi kesehatan. Fitoestrogen memiliki aktivitas estrogenik karena memiliki kesamaan struktur dengan estrogen alami. Aksi fitoestrogen terjadi dengan menempel pada reseptor estrogen sehingga menghambat pengikatan estrogen alami pada reseptor tersebut. Namun aksi fitoestrogen diketahui lebih lemah dari estrogen alami. Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek paparan tepung kedelai dan tepung tempe sebagai sumber fitoestrogen terhadap reproduksi *M. Musculus*, yang ditunjukkan dengan perubahan jumlah kelenjar endometrium uterus. Hewan uji berupa 32 mencit betina dewasa. Bahan uji berupa tepung kedelai diberikan secara oral dengan dosis 0,975 mg/ekor/hari sedangkan tepung tempe diberikan dengan dosis 0,148g/BB/hari, selama 48 hari. Air minum dan pakan BR2 diberikan secara *ad libitum*. Sampel uterus diisolasi pada setiap fase penyusun siklus estrus, selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan histologis dengan metode parafin dan pewarnaan HE dengan ketebalan 6 μ . Data dianalisis dengan uji beda Anova dengan pola faktorial pada taraf signifikansi 5%. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan tidak bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan sehingga dapat disimpulkan bahwa efek yang muncul lebih disebabkan oleh aksi hormon estrogen alami dalam tubuh hewan uji.

Kata kunci : Kelenjar endometrium, M. musculus L., Fitoestrogen

PENDAHULUAN

Konsumsi senyawa fitoestrogen oleh masyarakat akhir-akhir ini mengalami peningkatan yang cukup pesat. Hal ini disebabkan fitoestrogen diyakini memiliki banyak manfaat dalam kesehatan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa fitoestrogen bermanfaat mencegah penyakit kardiovaskular atau antiarterosklerosis (Purwoko dan Suyanto, 2001), mencegah kanker karena memiliki aktivitas antioksidan, serta mengurangi berbagai gejala serta keluhan menopause (Purwoko dan Suyanto, 2001; Achadiat, 2003; Winarsi, 2005). Efek antikanker fitoestrogen telah terbukti dalam menekan pertumbuhan sel kanker prostat atau kanker payudara (Mei dan Kung, 2001) Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa wanita Jepang yang mengkonsumsi produk olahan kedelai 40 – 50 mg/hari menunjukkan resiko kanker payudara 4 – 5 kali lebih rendah dan siklus menstruasi yang lebih panjang, yaitu 32 hari. Purwoko dan Suyanto (2001) juga menyatakan bahwa fitoestrogen juga bermanfaat sebagai antiosteoporosis dan merupakan agen estrogenik.

Fitoestrogen merupakan suatu senyawa yang bersifat estrogenik yang berasal dari tumbuhan. Fitoestrogen dapat digolongkan menjadi isoflavonoid dan lignan. Isoflavonoid terdapat dalam legume, khususnya pada kedelai, semua olahan padi, kentang, buah dan sayur, sedangkan lignan merupakan komponen minor dinding sel,

serat pada biji, buah, sayur, padi, dan kacang-kacangan. Isoflavonoid dibagi menjadi tiga kelompok yaitu isoflavan, isoflavan dan coumestan. Genistein dan daidzein merupakan contoh isoflavan, sedangkan equol termasuk isoflavan dan coumestrol termasuk dalam coumestan (Whitten dan Pattisaul, 2001). Coumestan terdapat dalam biji bunga matahari dan kacang-kacangan (Achadiat, 2003).

Fitoestrogen memiliki dua gugus hidroksil (OH) yang berjarak 11,0 – 11,5 Å pada intinya, sama persis dengan estrogen. Jarak 11 Å dan gugus OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik, sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen (Achadiat, 2003). Penelitian menggunakan mencit yang diovariectomi kemudian diberi fitoestrogen menunjukkan aktivitas proliferasi sel-sel endometrium (Haibin *et al.*, 2005). Penelitian tersebut membuktikan kemampuan fitoestrogen untuk berikatan dengan reseptor estrogen pada jaringan. Namun, potensi fitoestrogen diketahui lebih kecil (0,01 – 0,001) dari potensi estrogen alami (Murkies *et al.*, 1998; Anonim, 2002; Winarsi, 2005).

Struktur kimia fitoestrogen memiliki kemiripan dengan struktur kimia estrogen pada mammalia. Cincin fenolat pada isoflavan merupakan struktur penting pada sebagian besar komponen isoflavan yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptor

estrogen (Leclerg dan Heuson (1979) dalam Winarsi, 2005). Struktur equol apabila ditumpangkan pada struktur estrogen maka jarak antara gugus hidroksil keduanya sangat identik, oleh sebab itu fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen (RE) (Mendelson (1996) dalam Winarsi, 2005). Fitoestrogen merupakan kompetitor aktif untuk reseptor estrogen, terutama reseptor β (Whitten dan Pattisaul, 2001).

Mekanisme kompetisi fitoestrogen terhadap estrogen endogen adalah dengan menghambat aktivitas enzim DNA isomerase II sehingga ekspresi protein dalam sel terhambat. Mekanisme tersebut juga terjadi dalam penghambatan fitoestrogen terhadap siklus sel (Prawiroharsono, 2001). Fitoestrogen juga merupakan inhibitor bagi aromatase yang berperan dalam pembentukan estradiol (Almstrup *et al.*, 2002 dalam Moggs *et al.*, 2004). Fitoestrogen juga mempengaruhi ketersediaan estradiol dengan menghambat 17β hidroksisteroid dehidrogenase I (Whitten dan Pattisaul, 2001). Namun, efek fitoestrogen bersifat bifasik terhadap sintesis DNA, yaitu pada konsentrasi 0,1 – 10 μ M dapat menginduksi sintesis DNA sedangkan pada konsentrasi 20 – 90 μ M bersifat menghambat sintesis DNA (Wang dan Kurzer, 2003).

Paparan fitoestrogen dalam bentuk isoflavon terbukti mempengaruhi struktur organ reproduksi. Hasil penelitian Awoniyi

et al. (1998) menunjukkan bahwa paparan genistein dengan dosis 50 mg/hari pada tikus sejak hari ke- 17 kebuntingan sampai berakhirnya masa laktasi (21 hari *postpartum*) dapat menurunkan berat ovarium dan uterus serta kadar estradiol dalam serum. Hal tersebut dapat terjadi karena dalam organ reproduksi memiliki reseptor estrogen (Cooke *et al.*, 1995; Chateu dan Boehm, 1995; Awoniyi *et al.*, 1998).

Uterus merupakan salah satu organ reproduksi betina yang berfungsi sebagai penerima dan tempat perkembangan ovum yang telah dibuahi. Uterus pada mencit berupa tabung ganda, disebut tipe dupleks (Partodihardjo, 1988). Dinding uterus terdiri dari tiga lapisan utama, yaitu lapisan paling dalam yang disebut endometrium, miometrium merupakan lapisan tengah dan perimetrium yang merupakan lapisan terluar (Burkitt *et al.*, 1993). Lapisan endometrium merupakan lapisan yang responsif terhadap perubahan hormon reproduksi, sehingga perubahan lapisan ini bervariasi sepanjang siklus estrus dan dapat dijadikan indikator terjadinya fluktuasi hormon yang sedang terjadi pada hewan tersebut (Johnson and Everitt, 1988; Dellman and Brown, 1992).

Lapisan endometrium uterus merupakan lapisan yang terdiri dari tiga daerah fungsional, yaitu stratum basalis, stratum spongiosum dan stratum kompakum. Stratum spongiosum dan

kompaktum disebut juga stratum fungsional. Stratum fungsional dilapisi oleh epitel berbentuk kubus selapis (tunggal). Stratum fungsional dapat mengalami degenerasi sebagian atau seluruhnya secara periodik selama siklus estrus sedangkan stratum basalis relatif tetap dan bertindak sebagai pembentuk stratum fungsional yang mengalami degenerasi (Johnson and Everitt, 1988; Burkitt *et al.*, 1993).

Endometrium uterus dilengkapi dengan kelenjar dan pembuluh darah. Kelenjar endometrium merupakan kelenjar yang tersusun atas epitel kolumnar dengan nuklei di bagian bawah. Kelenjar ini melebar dan terbuka pada permukaan endometrium. pembuluh darah yang terdapat dalam endometrium terdiri dari dua bentuk pembuluh darah, yaitu spiral dan lurus. Kelenjar maupun pembuluh darah mengalami perubahan struktur sepanjang siklus estrus. Peningkatan hormon estrogen yang terjadi dari fase proestrus sampai fase estrus menyebabkan pertumbuhan serta percabangan kelenjar, sedangkan kenaikan progesteron setelah fase estrus menyebabkan peningkatan aktivitas sekresi kelenjar endometrium. Perkembangan struktur kelenjar sepanjang siklus estrus berjalan seiring dengan pertambahan tebal endometrium uterus (Burkitt *et al.*, 1993; Cooke *et al.*, 1995; Chateu dan Boehm, 1995).

Perubahan struktur histologi uterus disebabkan karena pada lapisan penyusun dinding uterus memiliki reseptor estrogen, sehingga perubahan struktur lapisan tersebut berjalan seiring dengan perubahan kandungan hormon tersebut sepanjang siklus estrus (Cooke *et al.*, 1995; Verrals, 1997; Hillisch *et al.*, 2004). Klein (1998) menyatakan bahwa reseptor estrogen dalam jaringan tubuh terdiri dari dua macam, reseptor alfa (RE α) dan reseptor beta (RE β) dengan tempat distribusi yang berbeda. Reseptor α lebih banyak terdistribusi pada jaringan penyusun organ reproduksi sedangkan reseptor β terdistribusi di luar jaringan reproduksi. Perbedaan letak reseptor ini menyebabkan perbedaan efek paparan senyawa estrogenik pada hewan uji.

Konsumsi fitoestrogen pada manusia umumnya diperoleh dari produk makanan berbahan dasar kedelai atau produk olahannya. Dalam setiap 100 gram kedelai diketahui mengandung isoflavon berupa daidzein sebanyak 46,64 mg dan genistein 73,76 mg. Tempe merupakan produk olahan kedelai yang memiliki kandungan daidzein 405 μ g dan genistein 422 405 μ g (USDA (1999) dalam Winarsi, 2002). Sari (2002) menyatakan bahwa jumlah komponen genistein dan daidzein dalam tepung kedelai berkisar 3,4 mg/100g sedangkan pada tempe komponen gensitein dan daidzein mencapai hampir semilan kali lipatunya, yaitu 26,7 mg/100g. Tempe juga

mengandung isoflavon yang lebih kuat daripada isoflavon dalam kedelai, yaitu antioksidan faktor II atau dikenal 6, 7, 4 trihidroksi isoflavon (Astawan, 2003).

Penelitian tentang fitoestrogen yang telah dilakukan umumnya hanya menggunakan bahan aktif fitoestrogen seperti genistein dan coumestrol sehingga kemungkinan memunculkan hasil yang berbeda jika pengujian dilakukan dengan keseluruhan bahan, seperti tepung kedelai atau tepung tempe. Berlatar belakang hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk menganalisis efek konsumsi harian tepung kedelai dan tepung kedelai sebagai sumber fitoestrogen terhadap reproduksi mencit yang dikaji melalui jumlah kelenjar endometrium uterus.

METODOLOGI

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit betina dewasa strain Swiss Webster, sebanyak 32 ekor, berumur 35 hari, dengan berat 25 – 30 gram. Hewan uji dipelihara dalam kandang individu terbuat dari plastik dengan atap berupa ram kawat. Pakan dan minum hewan uji diberikan secara *ad libitum*. Pakan hewan uji berupa pellet BR2 sedangkan air minum berupa air PAM. Pemeliharaan hewan uji dilakukan pada laboratorium dengan kondisi yang terkontrol dan konstan.

Pengamatan Siklus Estrus

Siklus estrus ditentukan dengan melihat hasil apus vagina dan pewarnaan GIEMSA, sesuai metoda Brancroft and Steven (1996). Sampel apus vagina diambil setiap hari sekitar jam 10 pagi. Penentuan fase penyusun siklus estrus dilakukan dengan melihat perbandingan sel epitel berinti, sel epitel menandung (kornifikasi), leukosit dan lendir, pada hasil apus vagina.

Bahan uji dan Perlakuan Hewan Uji

Bahan perlakuan dalam penelitian ini adalah tepung kedelai yang diberikan secara oral dengan pelarut akuades. Dosis perlakuan ditentukan berdasarkan dosis harian fitoestrogen untuk manusia menurut Nugroho dan Murwoko (2004) yaitu 0,6 mg/orang/hari dengan konversi menurut Laurence dan Bacharach (1964). Berdasarkan penghitungan tersebut, dosis tepung kedelai yang diberikan adalah 0,975 mg sedangkan tepung tempe sebesar 0,148g. Perlakuan diberikan setiap hari pada siang hari.

Penentuan Jumlah Kelenjar Endometrium Uterus

Sampel uterus diisolasi pada setiap fase penyusun siklus estrus. Uterus dibuat sediaan histologis dengan pewarnaan HE dengan ketebalan 6 μ secara seri. Penentuan jumlah kelenjar endometrium dilakukan dengan menghitung/mencacah pada setiap sayatan uterus. Pengamatan dan penghitungan dilakukan dengan cara

merunut berdasarkan posisi kelenjar pada tiap sayatan uterus. Kelenjar yang telah dihitung pada sayatan terdahulu tidak dihitung lagi pada sayatan berikutnya, sedangkan penampang melintang kelenjar yang baru pada sayatan berikutnya dihitung sebagai kelenjar yang baru. Hal ini dilakukan dari awal sampai dengan akhir sayatan organ.

Analisa Data

Data yang diperoleh ditabulasikan dan untuk mengetahui uji beda yang digunakan dilakukan uji homogenitas serta uji distribusi normal. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dilakukan uji Anova dengan pola faktorial.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penghitungan jumlah kelenjar endometrium uterus mencit selama satu siklus estrus setelah perlakuan dengan tepung kedelai dan tepung tempe sebagai sumber fitoestrogen disajikan pada tabel 01.

Hasil analisis data penelitian yang disajikan pada Tabel 01. menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada jumlah kelenjar endometrium pada fase diestrus dengan fase proestrus. Perbedaan bermakna juga ditunjukkan pada fase proestrus dan estrus, sedangkan fase estrus dan metestrus menunjukkan perbedaan tidak bermakna. Jumlah kelenjar pada semua fase penyusun siklus estrus kelompok kontrol menunjukkan perbedaan tidak bermakna dengan kelompok perlakuan 1 (Tepung Kedelai) dan kelompok perlakuan 2 (Tepung Tempe).

Tabel 01. Jumlah kelenjar endometrium uterus mencit (*Mus musculus* L.) selama satu siklus estrus setelah paparan tepung kedelai dan tepung tempe sebagai sumber fitoestrogen

Variabel	Kelompok	Fase Siklus Estrus			
		DE X ± SD	PE X ± SD	E X ± SD	ME X ± SD
Jumlah Kelenjar	K	48,25 ^a ± 2,98	58,50 ^b ± 1,29	78,25 ^c ± 0,96	77,25 ^c ± 0,96
	P1	49,00 ^a ± 1,41	58,75 ^b ± 1,71	78,50 ^c ± 1,29	78,25 ^c ± 2,21
	P2	50,00 ^a ± 1,83	59,25 ^b ± 1,71	78,00 ^c ± 1,41	77,50 ^c ± 2,38

Keterangan : Angka yang diikuti dengan superskrip yang sama dalam kolom dan fase siklus estrus yang sama menunjukkan berbeda tidak bermakna pada taraf kepercayaan 95%.
 Angka yang diikuti dengan superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda bermakna pada taraf kepercayaan 95%.
 K = Kontrol ; P1 = Perlakuan Tepung Kedelai ; P2 = Perlakuan Tepung Tempe

Uterus merupakan organ reproduksi yang memiliki reseptor estrogen (Johnson

dan Everitt, 1988; Cooke *et al.*, 1995; Oduma *et al.*, 1995; Haibin, 2005) sehingga

perubahan yang terjadi pada lapisan penyusun dinding uterus merupakan hasil regulasi hormon reproduksi dalam plasma. Perkembangan endometrium uterus ditunjukkan dengan perubahan ukuran tebal endometrium, yang dapat dibedakan menjadi dua fase utama yaitu fase proliferasi dan fase sekresi. Fase proliferasi terjadi fase diestrus sampai dengan fase estrus, ditandai dengan kenaikan ukuran tebal endometrium seiring dengan kenaikan hormon estradiol dalam plasma. Fase sekresi merupakan fase yang terjadi dari fase metestrus sampai dengan fase diestrus, ditandai dengan aktivitas sekresi kelenjar endometrium uterus sebagai hasil regulasi hormon progesteron dalam plasma (Johnson dan Everitt, 1988; Burkitt *et al.*, 1999).

Salah satu penentu kenaikan ukuran tebal endometrium uterus adalah proliferasi dan diferensiasi kelenjar endometrium. Kelenjar uterus di dalam endometrium merupakan kelenjar tubular sederhana yang mengalami perubahan sepanjang siklus estrus. Perkembangan yang terjadi pada kelenjar menyebabkan kelenjar mengalami percabangan berulang kali sehingga jumlah sayatan melintang kelenjar semakin meningkat jumlahnya dalam sayatan uterus (Johnson dan Everitt, 1988; Chateu and Boehm, 1995; Cooke *et al.*, 1995; Burkitt *et al.*, 1999).

Pengamatan pada semua fase penyusun siklus estrus dilakukan untuk

melihat apakah terdapat fase yang lebih responsif terhadap paparan bahan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua fase penyusun siklus estrus tidak menunjukkan perbedaan respon yang berarti terhadap paparan bahan uji. Penyebab utama perbedaan tidak bermakna efek estrogenik fitoestrogen dalam penelitian ini disebabkan fitoestrogen memiliki afinitas berbeda terhadap reseptor estrogen dalam tubuh. Dalam tubuh hewan betina terdapat dua macam jenis reseptor estrogen, yaitu reseptor alfa dan beta (Klein, 1998 dalam Winarsi, 2005). Reseptor estrogen terdistribusi lebih banyak pada hipotalamus-hipofisis, tulang, kandung kemih dan epitel pembuluh darah, sedangkan reseptor alfa lebih banyak terdistribusi pada jaringan penyusun organ reproduksi (Gustaffson, 1999 dalam Winarsi, 2005). Fitoestrogen memiliki afinitas yang lebih kuat pada reseptor beta (Mei dan Kung, 2001) yang terdistribusi pada jaringan di luar organ reproduksi sehingga tebal endometrium maupun jumlah kelenjar tidak menunjukkan perbedaan tidak bermakna.

Potensi fitoestrogen yang lebih lemah dibandingkan dengan estrogen alami merupakan penyebab kedua perbedaan tidak bermakna efek estrogenik dalam penelitian ini. Hillisch *et al.* (2004) menyatakan bahwa potensi fitoestrogen 10^{-3} – 10^{-5} kali dibanding estrogen alami sehingga

walaupun fitoestrogen dapat bergabung dengan reseptor tetapi tidak dapat memunculkan efek yang sama kuatnya dengan efek estrogen alami.

Perkembangan kelenjar terjadi karena estrogen akan menyebabkan proliferasi, morfogenesis, serta sitodiferensiasi jaringan yang memiliki reseptor estrogen (Cooke *et al.*, 1995). Hasil penelitian ini menunjukkan proliferasi, morfogenesis dan sitodiferensiasi kelenjar endometrium terjadi dari fase diestrus sampai fase estrus ditunjukkan dengan hasil analisis yang berbeda bermakna. Proses proliferasi dan diferensiasi diawali dengan perlekatan estrogen pada reseptor dalam sel-sel penyusun kelenjar endometrium. Selanjutnya gabungan estrogen dan reseptor ini akan mengawali terjadinya sintesis protein dan menyebabkan terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel penyusun kelenjar endometrium (Johnson dan Everitt, 1988; Chateu and Boehm, 1995; Cooke *et al.*, 1995; Wheeler dan Burkitt, 1999).

Karp (1996) menyatakan bahwa diferensiasi, termasuk diferensiasi kelenjar, merupakan suatu proses perubahan dari sel yang relatif sederhana dan belum terspesialisasi menjadi sel dengan struktur dan fungsi yang sangat terspesialisasi. Hasil diferensiasi sel adalah serangkaian bentuk sel dengan perbedaaan struktur dan fungsi sel yang jelas dengan kandungan materi yang unik. Perbedaan tipe, jumlah dan

bentuk sel serta lokasi organela sel hasil diferensiasi berkorelasi dengan aktivitas sel yang didukungnya. Hasil penelitian ini menunjukkan proliferasi dan morfogenesis kelenjar endometrium terjadi dari fase diestrus sampai fase estrus, sedangkan dari fase estrus sampai dengan metestrus merupakan fase sekresi sebagai hasil sitodiferensiasi sel penyusun endometrium. Pada fase metestrus sudah tidak terjadi proliferasi sehingga jumlah kelenjar menunjukkan perbedaan tidak bermakna dengan fase estrus. Johnson dan Everitt (1988) menyatakan bahwa hal itu terjadi karena setelah fase estrus ke fase metestrus merupakan fase sekretoris yang ditunjukkan dengan terjadinya sitodiferensiasi kelenjar, bukan proliferasi.

Kemurnian serta cara paparan bahan uji juga merupakan faktor penentu efek fitoestrogen pada hewan uji. Naciff (2004) membuktikan paparan genistein dengan dosis 148mg/kgBB/hari secara injeksi mempengaruhi ekspresi gen uterus pada mencit (*Mus musculus* L.) pada mencit *immature*. Pada penelitian ini menggunakan bahan uji berupa tepung kedelai dan tepung tempe sehingga diduga tidak memunculkan efek yang sama dengan penelitian tersebut.

Kandungan isoflavon daidzein dan genistein pada tepung tempe diketahui lebih banyak daripada tepung kedelai, tetapi jumlah yang dapat dikonsumsi dalam 100 gram bahan tepung tempe lebih sedikit

daripada tepung kedelai (USDA, 1999 dalam Winarsi, 2002). Hal tersebut menyebabkan perbedaan tidak bermakna antara paparan tepung kedelai dan tepung tempe pada jumlah kelenjar endometrium uterus hewan uji. Fitoestrogen dalam tepung kedelai dan tepung tempe yang diberikan secara oral diduga tidak mempengaruhi regulasi estrogen alami dalam tubuh hewan uji sehingga proliferasi sel maupun aktivitas sekretoris kelenjar uterus juga tidak mengalami gangguan.

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan tidak bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan sehingga dapat disimpulkan bahwa efek yang timbul lebih disebabkan oleh aksi hormon estrogen alami dalam tubuh hewan uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Achadiat, C.M. 2003. Klinik Net. <http://situs.kesepro.info/aging/jul/2003/ag01.ham>. 8 Februari 2005.
- Astawan, M. 2003. Tempe. <http://www.komps.co.id/news/0307/03/092312.htm>. 29 September 2006.
- Awoniyi, C.A., D. Robert, D.N. Veeramachaeni, B.S. Hurst, K.E. Tucker dan W.D. Schalff. 1998. Reproductive Sequelae in Female Rats after in Utero and Neonatal exposure to the Phytoestrogen Genistein. *Fertil. Steril.* 70 (3) : Abstract.
- Brancroft, J.D. dan A. Stevens. 1999. Theory and Practise of Histological Techniques. Fourth Ed. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Burkitt, H.G., B. Young dan J.W. Heath. 1999. *Wheaters Functional Histology. A Text and Colour Atlas.* Third Ed. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Chateu, D and E.M. Brown. 1995. Regulation of Differentiation and Keratin 10 Expression by All-trans Retinoic Acid during Estrous Cycle in the Rat Vaginal Epithelium. *Cell and Tissue Research.* 284 : 373 – 381.
- Cooke, P.L., D.L. Buchanan, D.B. Lubchan dan G.R. Cunha. 1995. Mechanism of estrogen action : lessons from the estrogen receptor- α knockout Mouse. *Biol. Reprod.* 59 : 470 – 475.
- Dellmann, H.D. and E.M. Brown, 1992. Buku Teks Histologi Veteriner II. Third Edition. Alih bahasa : R. Hartono. Penerbit UI. Jakarta
- Haibin, W., T. Sussane, X. Huirong, H. Gregory, K.D. Sanjoy and K.D. Sudhansu, 2005. Variation in Commercial Rodent Diets Induces Disparate Molecular and Physiological Changes in The Mouse Uterus. *PNAS.* 28 (102) : 9960 – 9965.
- Hillisch, A. O. Peter, D. Kosemund, G. Muller, A. Waller, B. Schneider, G. Reddersen, W. Eiger dan K.H. Fritzeimer. 2004. Dissecting Physiological Roles on Estrogen α and β Potent Selective Ligands from Structure-Based Design. <http://www.ehpoline.org/realfiles/2004/6848/6848.html>. 26 Maret 2007.
- Johnson, M.H. dan B.J. Everitt, 1988. *Essential Reproduction.* Third Edition. Blackwell Sci. Publ. London.
- Laurence, D. dan A.L. Bacharach, 1964. *Evaluation of Drug Activities. Pharmacometrics.*
- Mei, J. dan A.W.C. Kung, 2001. Phytoestrogen and Women Health. *Medical Progress* : 13 – 17.

- Murkies, A. L., G. Wilcox dan S.R. Davis, 1998. Phytoestrogens. <http://jcem.endojournals.org>. 12 September 2005.
- Nugroho, A. dan D. Murwoko, 2004. Produk-produk Bio Phytofarmaca Medicine (ramuan, substract, microbia) Sebagai Alternatif Produk Obat yang Lebih Aman. Seminar Nasional Biophytopharmaca. Teknik Kimia UNDIP. Semarang
- Oduma, J.A., E.O. Wango, D.O. Okulo, D.W. Mawakitri, W. Odongo, 1995. In vivo and in vitro effect of graded doses of the pesticide heptachlor on female sex steroid hormone production in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 111 (2) : 191 – 196.
- Pawiroharsono, S., 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/042001/pus-2.htm>. 8 Februari 2005.
- Purwoko, T. Dan P. Suyanto, 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae*. *UICC. Biosmart.* 3 (2) : 7 – 12.
- Sari, D. Yuanita. 2002. Kecedlail Sahabat Jantung. <http://www.kompas.com/kesehatan/news/senior/0204/24/apt.htm>. 27 April 2007.
- Wang, C. dan M.S. Kurzer, 2003. Phytoestrogen Concentration Determines Effects on DNA Synthesis in Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* 28 (3) : Abstract.
- Winarsi, H. 2005. Isolavon Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya Pada Penyakit Degeneratif. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Whitten, Patricia L. dan H.B. Pattisaul, 2001. Cross-species dan interassay Comparison of Phytoestrogen Action. Environmental Health Perspectives Supplements. Volume 109. Departemen Anthropology and Center for Behavioural Neuroscience Emory University. Atlanta. Georgia USA.