

POTENSI BIJI LABU KUNING SEBAGAI AGEN FITOESTROGEN PADA WANITA POST MENSTRUAL

Beni Lestari, Naisbitt Iman Hanif, Ariska Deffy
Anggarany, Thoriq Ziyad, Ziana Walidah,
Retno Murwanti*

Farmasi, Fakultas Farmasi,
Universitas Gadjah Mada
email: beni_e112@ymail.com
email: imanhnf8@gmail.com

Abstract

Osteoporosis and hypercholesterolemia are prevalent condition in menopausal women. The common therapy to prevent the estrogen degrading condition is Hormone Replacement Therapy (HRT). However, HRT possessed various risks. Curcubita pepo L. seed (pumpkin seed) contains lignan secoisolariciresinol and lariciresinol which exhibit estrogenic effect. The aim of this study is to determine the estrogenic effect of Ethanolic Extract of Pumpkin Seeds (EEPS) through in silico and in vivo study. In silico study were conducted by molecular docking of lignan which is secoisolariciresinol and lariciresinol with Estrogen Receptor (ER α and ER β). In vivo study conducted by using ovariectomized Sprague dawley female rats as a model of postmenopausal women. Blood lipid profile, bone density, and uterine weight were assayed after thirty days. Molecular docking score of secoisolariciresinol and lariciresinol were similar to estradiol. In vivo study found that EEPS increase bone density and uterine weight percentage while also improve the blood profile. In conclusion, these result showed that EEPS is potential to be developed as an osteoporosis and hypercholesterolemia prevention agent.

Keywords: Lime peel, Limonene, Aromatic candles, Repellent

1. PENDAHULUAN

Post menstrual atau menopause merupakan proses alamiah yang akan dialami oleh setiap wanita. Pada masa ini, wanita mengalami defisiensi hormon estrogen yang memiliki peranan dalam regulasi reproduksi, modulasi kepadatan tulang, transport

kolesterol serta stimulasi proliferasi sel epitel kelenjar payudara [8]. Kekurangan hormon estrogen menimbulkan berbagai gangguan fungsi fisiologis seperti osteoporosis dan penyakit kardiovaskular seperti hiperkolesterolemia [9].

Substitusi estrogen dari luar tubuh dengan HRT (*Hormone Replacement Therapy*) merupakan upaya yang telah banyak dilakukan. Namun, HRT dapat menimbulkan cacat fisik, pendarahan, ketergantungan serta resiko kanker payudara [2]. Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif yang aman dan murah sebagai pengganti HRT, salah satunya adalah dengan fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa pada tumbuhan yang memiliki aktivitas estrogenik, sehingga dapat menggantikan fungsi estrogen [17].

Salah satu bahan alam yang diduga berpotensi sebagai sumber fitoestrogen adalah biji labu kuning (*Cucurbita pepo* L.) yang mengandung *secoisolariciresinol* dan *lariciresinol*, yaitu senyawa golongan lignan yang memiliki kerangka mirip estrogen [14]. Penelitian ilmiah mengenai efek estrogenik dari biji labu kuning belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, studi ini bertujuan untuk mengetahui efek estrogenik biji labu kuning terhadap profil kepadatan tulang dan kadar kolesterol pada tikus betina galur *Sprague Dawley* ter-ovariektomi. Penelusuran mekanisme molekuler dengan metode *docking* juga dilakukan untuk mengetahui interaksi senyawa lignan dalam biji labu dengan reseptor estrogen. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam mengembangkan produk suplemen nutrasetikal dari biji labu kuning sebagai agen pencegah osteoporosis dan kolesterol pada wanita menopause.

Penelitian ini dilakukan untuk mengembangkan potensi bahan alam sebagai agen pencegah osteoporosis dan hiperkolesterol untuk wanita *post menstrual*. Selain itu, hasil penelitian ini dapat dipublikasikan menjadi sebuah jurnal ilmiah serta dapat menjadi dasar pembuatan produk nutrasetikal yaitu suplemen yang dipatenkan sehingga dapat dimanfaatkan secara luas oleh masyarakat.

Peran Estrogen terhadap Densitas Tulang dan Kadar Kolesterol

Estrogen merupakan hormon kelamin utama pada wanita. Hormon ini berperan dalam diferensiasi sel, jaringan reproduksi, perlindungan terhadap osteoporosis, dan sebagai hormon kardioprotektif yang beraksi dengan meningkatkan kadar HDL dan menurunkan LDL [7]. Aksi biologis hormon estrogen diperantarai oleh reseptor estrogen, yang termasuk dalam golongan reseptor inti [10].

Osteoporosis adalah penyakit yang ditandai dengan berkurangnya massa tulang dan adanya berubahnya mikro-arsitektur jaringan tulang yang berakibat menurunnya kekuatan tulang dan meningkatnya kerapuhan tulang [3]. Kecepatan resorpsi dan deposisi tulang baru untuk menggantikan yang hilang dipengaruhi oleh sirkulasi kadar estrogen. Pada saat kadar estrogen rendah yang biasanya terjadi pada wanita menopause, kemampuan pembentukan tulang akan menurun sedangkan resorpsi tulang akan meningkat [5].

Kolesterol merupakan senyawa kimia alami tubuh yang berperan dalam banyak proses metabolisme dalam tubuh. Estrogen juga merupakan faktor penting dalam homeostasis kolesterol dengan meregulasi fungsi mitokondrial hepar. Estrogen yang berinteraksi dengan reseptor estrogen berperan dalam peningkatan HDL, penurunan kolesterol total, LDL, dan trigliserida [6]. Peningkatan kadar HDL darah disebabkan oleh peningkatan ekspresi protein apo A-1 yang selanjutnya akan meningkatkan kadar HDL dalam darah [4]. Penurunan kadar LDL disebabkan oleh aktivitas estrogen dalam meningkatkan transkripsi reseptor LDL. Semakin tinggi reseptor LDL yang terbentuk, semakin turun kadar LDL dalam darah [11].

Fitoestrogen dan Estrogen

Fitoestrogen merupakan senyawa dari tumbuhan yang memiliki kemiripan struktur dengan estrogen sehingga dapat menunjukkan sifat agonis pada *Estrogen Receptor* (ER). Kemampuan meniru efek estrogen oleh fitoestrogen didasarkan oleh keberadaan senyawa dengan BM setara dengan estrogen (272 g/mol), cincin fenolik sebagai binding site dan memiliki inti dengan dua gugus hidroksil dengan jarak 11,0-11,5Å [1]. Terdapat 4 jenis senyawa fitoestrogen yang

terkandung di dalam tanaman antara lain flavonoid, coumestan, lignan, dan stilben.

Biji Labu Kuning (*Cucurbita pepo* L.)

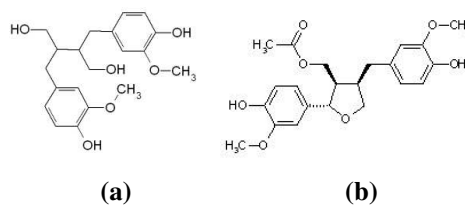
Buah labu kuning (gambar 1) merupakan jenis tanaman menjalar dari famili *cucurbitaceae* yang banyak tumbuh di Indonesia. Buah labu kuning berbentuk pipih, lonjong, atau panjang dengan banyak alur (15-20 alur) dan mempunyai bobot rata-rata 3-5 kg.

Pada penelitian ini penyusun ingin membuktikan apakah ekstrak kulit jeruk nipis juga memberikan efek sebagai pengusir kecoa *Periplaneta Americanus* walaupun telah dicampur parafin dan dibuat dalam bentuk lilin aromatik. Selain itu, penyusun juga ingin mengetahui berapa konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis yang efektif digunakan sebagai repellent, serta mengetahui hubungan lamanya waktu perlakuan dengan potensi ekstrak kulit jeruk nipis sebagai repellent.

Gambar 1. Labu Kuning (*Cucurbita pepo* L.)



Biji labu kuning diketahui mengandung senyawa *secoisolariciresinol* dan *lariciresinol* (gambar 2) yaitu senyawa golongan lignan [14]. Lignan merupakan salah satu golongan fitoestrogen.



Gambar 2. Struktur Secoisolariciresinol (a) dan Lariciresinol (b)

Nutrasetikal

Nutrasetikal adalah sejenis makanan (herbal, suplemen, atau minuman) yang memiliki manfaat untuk kesehatan secara medis, termasuk pencegahan dan pengobatan penyakit. Nutrasetikal dapat digunakan

secaraterpisah, kombinasi, atau ditambahkan ke dalam makanan atau minuman untuk manfaat kesehatan [15]. Nutrasetikal merupakan kombinasi dari fungsi nutrisi dan *pharmaceutical*. Produk nutrasetikal dapat diformulasikan menjadi sediaan farmasetik seperti pil, serbuk/bubuk, kapsul, vial dan lain sebagainya.

2. METODE

Biji labu kuning didapatkan dari Klero, Tenganan, Semarang, Jawa Tengah, etanol 70% (*E.Merck*), ketamin 100 mg/ml, Plain catgut sutures 3/0 Meiyi®, NaCl 0,9 % (PT Otsuka, Jakarta), Enbatic® antibiotic (PT Erela, Semarang), Betadin® (PT Mahakam Beta Farma, Jakarta), CMC-Na (*E.Merck*), aquades, formalin 10% (Asia lab.), estradiol (Sigma), reagen pengendap, reagen kit kolesterol, dan standar kolesterol.

Analisis Molecular Docking

Senyawa *secoisolariciresinol* dan *lariciresinol* dibuat struktur 3D menggunakan program MarvinSketch. Preparasi protein target dilakukan dengan *software* YASARA. Validasi *docking* dilakukan dengan program PLANTS 1.1 Manual. Pemilihan metode ditentukan oleh harga RMSD (*Root Mean Square Distances*) *heavy atom* (ligan) dengan ligan *copy*. Ligan alami yang digunakan adalah 17 β -estradiol, untuk membandingkan kekuatan ikatan ligan senyawa uji. Senyawa uji yang digunakan adalah senyawa *Secoisolariciresinol* dan *Lariciresinol*.

Ekstrak Etanolik Biji Labu Kuning (EEBL) Biji labu kuning didapatkan dari Klero, Tenganan, Semarang Jawa Tengah. Determiniasi dilakukan oleh Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Biji labu kuning dikeringkan dan diserbukhaluskan menjadi bubuk. Ekstraksi dilakukan dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi selama lima hari dan dilanjutkan dengan remaserasi selama tiga hari. Filtrat yang didapat, dipekatkan dengan *Rotary Evaporator* (RE)

Uji *In Vivo*

Tikus betina galur *Sprague Dawley* sebanyak 36 ekor ditempatkan dalam kandang plastik dengan alas sekam dan diberi makan berupa pellet serta diberi minum air PDAM yang masing-masing diberikan secara *ad libitum*. Ekstrak diberikan dalam bentuk suspensi dalam larutan CMC-Na 0.5%. Larutan ekstrak dibuat baru sebelum diberikan kepada hewan uji.

Tikus dibagi menjadi tujuh kelompok perlakuan dengan 4 ekor tikus tiap kelompok, yaitu: Kelompok I: base line non-ovariektomi, Kelompok II: base line ovariektomi, Kelompok III: kontrol ovariektomi, Kelompok IV: perlakuan CMC-Na 0,5% (kontrol negatif), Kelompok V:perlakuan estradiol 2 μ g/hari, Kelompok VI: perlakuan ekstrak dosis 500mg/kg BB, Kelompok VII: perlakuan ekstrak dosis 1000mg/kg BB

Tikus kelompok II hingga VII diovariektomi padausia 70 hari. Untuk kelompok I, tikus dikondisikan seolah-olah terovariektomi. Percobaan dilakukan selama 1 bulan, pada akhir percobaan semua tikus diambil darahnya sinus orbitalis dan dinekropsi untuk diambil tulang femur.

Analisis Profil Lipid Darah (LDL, HDL, Trigliserida, dan Kolesterol Total)

Sampel darah yang diambil dari sinus orbital diinkubasi dalam suhu ruangan selama 15 menit dan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 20 menit. Serum yang didapatkan digunakan untuk menentukan kadar LDL, HDL, trigliserida, dan kolesterol total menggunakan metode enzimatik-kolorimetrik.

Analisis kolesterol total dan trigliserida dilakukan dengan mencampurkan 10 μ L serum ke dalam 1 ml reagen kit kolesterol dan digojog secara perlahan pada suhu ruang selama 10 menit dan dibaca absorbansinya pada λ 546 nm.

Konsentrasi HDL ditentukan dengan deposisi lipoprotein yang bebas LDL, VLDL, dan klormikron. Kemudian dilanjutkan dengan metode enzimatik-kolorimetrik. Agen

pensuspensi yang digunakan ialah 0.2 ml Mg^{2+} dan 0.5 ml presipitat HDL yang mengandung $MgCl_2$ (25 mmol/L) dan asam fosfat (0.55 mmol/L). Campuran digojog perlahan dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 10 menit dan di sentrifugasi pada 1200 rpm selama 2 menit. Presipitat kemudian dipisahkan dari supernatan. Kemudian konsentrasi HDL diukur menggunakan spektrofotometer yang mengandung 0.1 ml supernatan dan 1 ml reagen kit kolesterol yang digojog perlahan dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 10 menit. Absorbansi dibaca pada λ 546 nm. Data kolesterol total, trigliserida, HDL, dan LDL dianalisis menggunakan statistika SPSS 15.0 metode ANOVA *one way* ($p < 0.05$)

Analisis Densitas Tulang

Tulang femur hewan uji yang diambil pada saat nekropsis dianalisis menggunakan sinar X-ray untuk diamati profil densitas tulang secara kualitatif. Sementara profil kuantitatif didapatkan berdasarkan nilai koefisien atonasi linier dan nilai densitas tulang (g/cm^3).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *in silico* melalui *molecular docking* dilakukan untuk memprediksi kemampuan senyawa aktif (ligan) untuk berinteraksi dengan reseptor estrogen ($ER\alpha$ dan $ER\beta$). Ligan alami yang digunakan adalah 17β -estradiol untuk membandingkan kemampuan ikatan atau afinitas secoisolariciresinol dan lariciresinol dengan estrogen reseptor. Parameter yang digunakan adalah *score docking*, semakin kecil *score docking* yang diperoleh semakin kuat ikatan senyawa dengan ligannya. *Score docking* senyawa ligan pada estrogen reseptor dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil *molecular docking* menunjukkan senyawa aktif EEBL yaitu secoisolariciresinol mempunyai afinitas ikatan yang lebih baik

terhadap $ER\alpha$ dan $ER\beta$ dibandingkan dengan ligan alami 17β -estradiol. Lariciresinol mempunyai afinitas yang lebih baik terhadap $ER\beta$ dan mampu berkompetisi dengan 17β -estradiol terhadap $ER\alpha$.

Tabel 1. *Score docking* pada $ER\alpha$ dan $ER\beta$

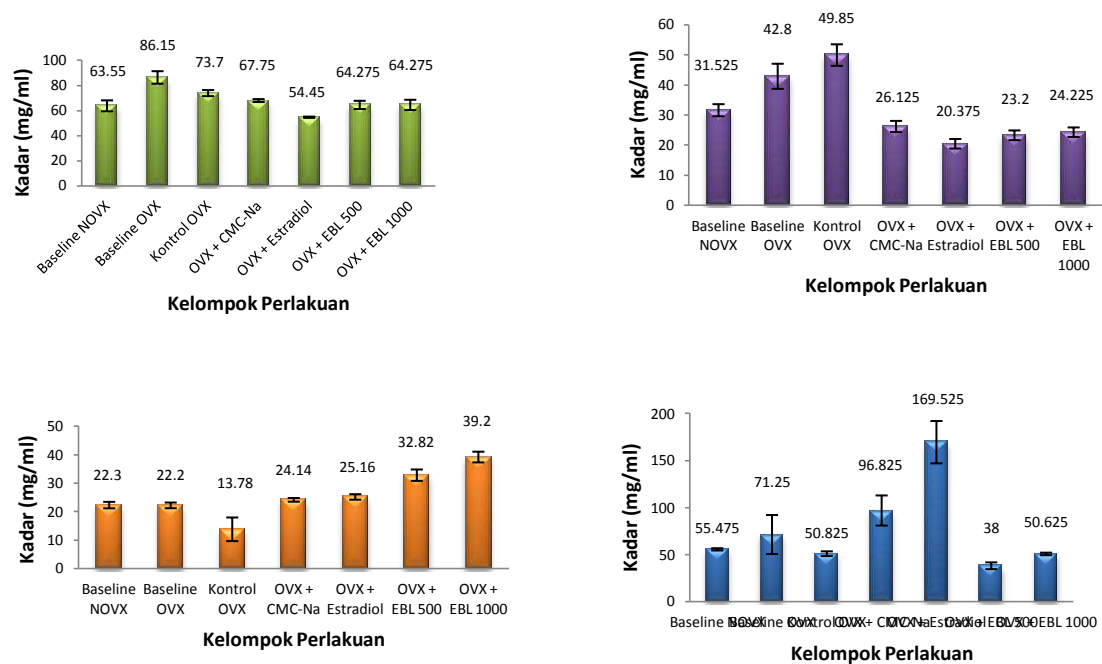
Ligan	Score	
	$ER\alpha$	$ER\beta$
Estrogen (17β -estradiol)	-88,792	-88,793
Secoisolariciresinol	-91,128	-95,865
Lariciresinol	-80,906	-90,289

Adanya interaksi fitoestrogen (senyawa ligan dalam biji labu kuning) dengan reseptor estrogen mengakibatkan terjadinya pengaktifan reseptor estrogen (ER). ER yang aktif akan dapat berikatan dengan *Estrogen Response Element* (ERE) ataupun faktor transkripsi dalam nukleus sehingga mampu menginduksi ekspresi *estrogen responsive gene* [6].

Data Profil Kolesterol Darah

Uji *in vivo* dilakukan dengan proses operasi ovariektomi yaitu pembedahan ovarium pada hewan uji dilakukan untuk memperoleh permodelan kondisi tubuh wanita yang mengalami defisiensi estrogen pasca menopause.

Dari hasil uji yang dilakukan, operasi ovariektomi menyebabkan kenaikan kadar LDL, trigliserida, dan kolesterol total serta penurunan sedikit HDL. Perlakuan dengan EEBL dosis 500 dan 1000 mg/kgBB dapat meningkatkan kadar HDL, dan menurunkan kadar LDL secara signifikan, serta menurunkan kadar Kolesterol total dan trigliserida meskipun tidak signifikan.



Gambar 3. Efek perlakuan ekstrak etanolik biji labu kuning terhadap profil kolesterol darah (a) Kolesterol total, (b) LDL, (c) HDL, (d) Triglicerida. Nilai menunjukkan rata-rata±SE. Tanda bintang (*) menunjukkan nilai signifikan terhadap kelompok tikus terovariektomi (Kontrol OVX) berdasarkan analisis statistika one way ANOVA dilanjutkan post-hoc Tuckey HSD taraf kepercayaan 95%.

Profil Densitas Tulang

Dari hasil analisis kualitatif menggunakan rontgen, diamati tingkat kepadatan tulang femur dari hewan uji akibat pengaruh perlakuan tiap kelompok. Berdasarkan gambar diatas tampak adanya perbedaan kepadatan tulang pada kelompok kontrol non-ovariektomi dan kelompok kontrol ovariektomi. Pada kelompok kontrol ovariektomi, tampak bahwa kepadatan tulang berkurang. Pada perlakuan dengan estradiol dapat meningkatkan kepadatan tulang dibandingkan kelompok ovariektomi.

Pada perlakuan EEBL 500 mg/kgBB dan EEBL 1000 mg/kgBB juga nampak adanya perbaikan kepadatan tulang dibandingkan kelompok ovariektomi. Namun hasil ini merupakan hasil uji kualitatif, sehingga perlu dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui efek perlakuan terhadap kepadatan tulang secara pasti.

Uji kuantitatif dilakukan berdasarkan metode rontgen untuk mencari nilai koefisien atonasi liner yang didasarkan pada nilai serapan bahan berupa tulang femur tikus. Dari hasil percobaan, didapatkan hasil berupa profil densitas kepadatan tulang tiap kelompok perlakuan yang dinyatakan dalam satuan gram/cm³.

Tabel 2. Nilai densitas tulang tikus

Kelompok	Densitas (gr/cm ³)
Baseline NOVX	1.6632 ± 0.02
Baseline OVX	1.3565 ± 0.04
OVX+CMC Na	1.7505 ± 0.02
OVX+Estradiol	1.8970 ± 0.02
OVX+EEBL 500 mg/KgBB	1.8879 ± 0.04
OVX+EEBL1000mg/K gBB	1.8625 ± 0.04

Dari hasil penelitian ini, uji statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa profil densitas tulang kelompok perlakuan baseline

ovarietomi (OVX) memiliki densitas tulang yang lebih rendah dibandingkan baseline nonovarietomi (NOVX) meskipun tidak signifikan. Sedangkan pada perlakuan menggunakan estradiol (OVX + Estradiol), EEBL dosis 500 mg/kgBB dan 1000 mg/kgBB dapat memberikan kenaikan nilai densitas tulang secara signifikan terhadap kelompok tikus terovarietomi (OVX).

Hal tersebut menunjukkan bahwa perlakuan EEBL pada hewan uji berupa tikus yang terovarietomi dapat menyebabkan terjadinya peningkatan densitas tulang. Mekanisme EEBL dalam meningkatkan densitas tulang memang masih belum dapat diketahui secara pasti, namun kemungkinan sama dengan mekanisme hormon estrogen dalam memodulasi kepadatan tulang.

Dalam mekanisme estrogen untuk memodulasi kepatan tulang, estrogen mempengaruhi *remodeling* tulang pada trabekular dan endokortikal [13]. Estrogen mempengaruhi aktivitas sel osteoblas maupun osteoklas, termasuk menjaga keseimbangan kerja dari kedua sel tersebut melalui pengaturan produksi faktor parakrin-parakrin. Hormon estrogen mempengaruhi terutama sel osteoblas. Sel osteoblas memiliki reseptor estrogen yaitu ER β dan ER α di dalam sitosol. Dalam diferensiasinya sel osteoblas mengekspresikan ER α 10 kali lipat dari ER α [12].

Dalam keadaan normal, estrogen dalam sirkulasi mencapai sel osteoblas, dan beraktivitas melalui reseptor yang terdapat di dalam sitosol sel tersebut, mengakibatkan menurunnya sekresi sitokin seperti: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), yang merupakan sitokin yang berfungsi dalam penyerapan tulang.

Di lain pihak estrogen meningkatkan sekresi *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), yang merupakan satu-satunya faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang merupakan mediator untuk menarik sel osteoblas ke tempat lubang tulang yang telah diserap oleh sel osteoklas. Jadi, sel osteoblas merupakan sel target utama dari estrogen, untuk melepaskan beberapa faktor pertumbuhan dan

sitokin seperti tersebut di atas, sekalipun secara tidak langsung maupun secara langsung juga berpengaruh pada sel osteoklas [12].

Kondisi defisiensi estrogen menyebabkan terjadinya osteoklastogenesis dan terjadi kehilangan tulang. Akan tetapi dengan pemberian estrogen terjadi pembentukan tulang kembali, dan didapatkan penurunan produksi dari IL-1, IL-6, dan TNF- α , begitu juga selanjutnya akan terjadi penurunan produksi *acrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) dan RANK-Ligand (RANK-L).

Di sisi lain estrogen akan merangsang ekspresi dari osteoprotegerin (OPG) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor*- β) pada sel osteoblas dan sel stroma, yang lebih lanjut akan menghambat penyerapan tulang dan meningkatkan apoptosis dari sel steoklas [12].

Data Bobot Uterus

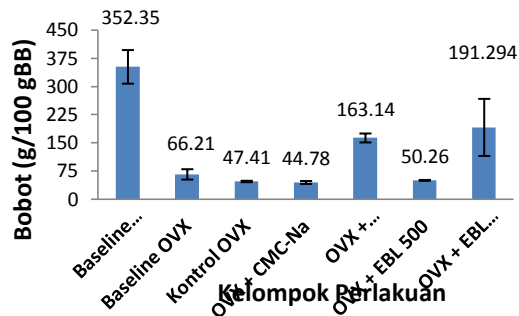
Salah satu parameter keberhasilan ovariectomi adalah berkurangnya bobot uterus pada tikus. Oleh karena itu dilakukan penimbangan bobot uterus sebagai data pendukung. Bobot uterus yang ada dinyatakan dalam persen bobot uterus, yakni berdasarkan rata-rata bobot uterus per 100 gram berat badan tikus (gr/100grBB).

Tabel 3. Bobot Uterus tikus

Kelompok	Bobot Uterus (g/100g BB)
Baseline NOVX	352.4 \pm 44.72
Baseline OVX	66.21 \pm 13.79
Kontrol OVX	47.41 \pm 1.92
OVX+CMC Na	44.78 \pm 3.89
OVX+Estradiol	163.1 \pm 11.89
OVX+EEBL 500 mg/KgBB	50.26 \pm 1.25
OVX+EEBL 1000 mg/KgBB	191.3 \pm 75.92

Dari hasil analisis yang dilakukan, terbukti dengan operasi ovariectomi dapat menurunkan persen bobot uterus tikus. Perlakuan dengan estradiol dan EEBL dosis 1000 mg/kgBB mampu menaikkan persen bobot uterus secara signifikan. Dengan demikian estradiol dan EEBL mampu

mempengaruhi bobot uterus dengan meningkatkan persen bobotnya.



Gambar 5. Grafik persen bobot uterus tikus.

Nilai menunjukkan rata-rata \pm SE. Tanda bintang (*) menunjukkan nilai signifikan terhadap kelompok tikus terovariectomi (Kontrol OVX) berdasarkan analisis statistika one way ANOVA dilanjutkan post-hoc Tuckey HSD taraf kepercayaan 95%.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan studi *in silico* dan *in vivo* yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa EEBL dapat digunakan sebagai sumber fitoestrogen yang terbukti memodulasi profil lipid darah secara parsial dan meningkatkan densitas tulang secara signifikan.

5. REFERENSI

[1] Benassayag C, Perrot-Applanat M, Ferre F. 2002. Phytoestrogen as modulators of steroid action in target cells. *J. Chromatogr. B* 777: 233-248.

[2] Beral V. 2003. Breast Cancer and Hormon Replacement Therapy in Women Study. *The Lancet*, **362**: 413-427.

[3] Depkes RI. 2008. Pedoman Pengendalian Osteoporosis. Jakarta: Keputusan MenKes RI.

[4] Harnish, D.C., Evans, M.J., Scicchitano, M.S., Bhat, R.A., dan Karanthanasis, S.K.1998. Estrogen Regulation of the Apolipoprotein A1 Gene Promoter through Transcription Cofactor Sharing. *The Journal Of Biological Chemistry*. **273**(15):9270-9278.

[5] Groff JL and Gropper SS. 2000. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. United State: Wadsworth Thomson Learning.

[6] Gruber, C.J., Walter, T., Christian, S., and Johannes, C.. 2002. Production and Action of Estrogens. *The New England Journal of Medicine*. 346(5):340-350.

[7] Ikawati, Z, 2008, *Pengantar Farmakologi Molekuler*, Gama Press, Yogyakarta.

[8] Jordan, V.Craig. 2004. Selective Estrogen Receptor Modulation: Concept and Consequences in Cancer. *Cancer Cel*. **15**:207-213.

[9] Kenny, A.M., Prestwood, and Raisz, L.G. 2000. The short term effects of tamoxifen on bone turnover in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. **80**:3287-3291.

[10] Matthews, J., and Gustafsson, J. 2003. Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β , *Molecular Interventions*, **3**: 281-292.

[11] Meyer, M.R., and Barton, M. 2006. Gender Differences of Cardiovascular Disease : New Perspectives for Estrogen Receptor Signaling, *Hypertension*, **47**:1019-1026.

[12] Monroe, D.G., Secreto, F.J., and Spelsberg, T.C., 2003, Overview of Estrogen Action in Osteoblasts: Role of the Ligand the Receptor and The Coregulators. *J. Musculoskelet Neuron Interact*, **4**, 357-362.

[13] Prince, R.L. and Draper, C., 2000, *Bone and Calcium* dalam Lobo, R.A., Kelsey, J., Marcus, R., (eds) Menopause: Biology And Pathobiology, Academic Press, San Diego California.

[14] Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Ong, D.M. and Metzler, M. 2003. Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J. Agric. Food Chem*. 51(5), 1181–1188.

[15] Syamsudin. 2013. Nutrasetikal. Yogyakarta: Graha Ilmu.

[16] Talbert. 2005. *Role of the National Cholesterol Education Program Adult treatment panel III guidelines in managing dyslipidemia*. Am J Health Syst Pharm. 60(13 Suppl 2):S3-8.

- [17] Yildiz F. 2005. Phytoestrogens in Functional Foods. *Taylor & Francis Ltd.*, 5:210-211.