

Bukti Korespondensi FARMASAINS 2015

AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN MENGGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY

Yahoo Mail - Artikel untuk Farmasains April 2015 - Google Chrome
about:blank

Artikel untuk Farmasains April 2015


From: binar asrining dhiani (binar_ad@yahoo.com)
To: farmasains_uhamka@yahoo.com; githafungie@gmail.com
Date: Thursday, May 28, 2015 at 02:27 PM GMT+7

Assalamualaikum,
Berikut saya kirimkan artikel untuk dipertimbangkan dimuat di Jurnal Farmasains bulan April 2015.
Terima kasih.
Wassalamualaikum

Binar Asrining Dhiani

*Faculty of Pharmacy
Muhammadiyah University of Purwokerto
Jalan Raya Dukuwaluh PO.BOX 202, Purwokerto 53182
Central Java, INDONESIA*

Mobile phone : +628122836830

 Aktivitas Estrogenik Biji Bunga Matahari dan Biji Wijen Menggunakan Metode YES_FARMASAINS.docx
85.4kB

29°C Cloudy 13:36 12/08/2022

Yahoo Mail - BIs: Artikel untuk Farmasains April 2015 - Google Chrome
about:blank

BIs: Artikel untuk Farmasains April 2015

From: Numlil Khaira (farmasains_uhamka@yahoo.com)
To: binar_ad@yahoo.com
Date: Monday, June 1, 2015 at 10:27 AM GMT+7

terima kasih atas kiriman naskah nya.

salam
redaksi

Pada Kamis, 28 Mei 2015 14:27, binar asrining dhiani <binar_ad@yahoo.com> menulis:

Assalamualaikum,
Berikut saya kirimkan artikel untuk dipertimbangkan dimuat di Jurnal Farmasains bulan April 2015.
Terima kasih.
Wassalamualaikum

Binar Asrining Dhiani

*Faculty of Pharmacy
Muhammadiyah University of Purwokerto
Jalan Raya Dukuwaluh PO.BOX 202, Purwokerto 53182
Central Java, INDONESIA*

Mobile phone : +628122836830

29°C Cloudy 13:37 12/08/2022

Yahoo Mail - BIs: revisi naskah jurnal farmasains - Google Chrome
about:blank

BIs: revisi naskah jurnal farmasains

From: Numlil Khaira (farmasains_uhamka@yahoo.com)
To: binar_ad@yahoo.com
Date: Saturday, September 19, 2015 at 10:50 AM GMT+7

terima kasih

Pada Jumat, 11 September 2015 16:52, binar asrining dhiani <binar_ad@yahoo.com> menulis:

Kepada Redaksi Farmasains

Berikut saya kirimkan naskah yang sudah saya koreksi sesuai dengan saran dan pertanyaan dari reviewer

Terima kasih

Binar Asrining Dhiani

Faculty of Pharmacy
Muhammadiyah University of Purwokerto
Jalan Raya Dukuwaluh PO.BOX 202, Purwokerto 53182
Central Java, INDONESIA

Mobile phone : +628122836830

On Tuesday, September 8, 2015 10:16 AM, Numlil Khaira <farmasains_uhamka@yahoo.com> wrote:

29°C Cloudy 13:39 12/08/2022

Yahoo Mail - BIs: revisi naskah jurnal farmasains - Google Chrome
about:blank

Faculty of Pharmacy
Muhammadiyah University of Purwokerto
Jalan Raya Dukuwaluh PO.BOX 202, Purwokerto 53182
Central Java, INDONESIA

Mobile phone : +628122836830

On Tuesday, September 8, 2015 10:16 AM, Numlil Khaira <farmasains_uhamka@yahoo.com> wrote:

Assalamu'alaikum wr.wb.

Yth. Binar Asrining Dhiani, Desi Reza Anomsari, Anna Aulia Kisti, Siti Mifahul Janah, Asmiyenti Djaliasrin Djali

Terima kasih atas kesediaan Ibu mengirimkan naskah ke jurnal kami, namun ada beberapa koreksian tambahan dari tim Mitra Bestari/reviewer yang harus segera Ibu perbaiki sebagai syarat publikasi pada jurnal kami. Diantara perbaikan tersebut yaitu pertanyaan dari reviewer kami yang telah di masukkan dalam naskah Ibu dan juga sudah kami lampirkan pada softcopy naskah Ibu di bawah ini.

Bersama ini kami lampirkan softcopy naskah Ibu yang harus direvisi. Kami harapkan perbaikan koreksian ini dikirim ke email kami farmasains_uhamka@yahoo.com paling lambat 4 hari.

Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

salam

Redaksi

29°C Cloudy 13:39 12/08/2022

**AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN
MENGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY**

***ESTROGENIC ACTIVITY OF SUNFLOWER AND SESAME SEEDS
DETERMINED BY YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY METHOD***

Binar Asrining Dhiani, Desi Reza Anomsari, Anna Aulia Kisti, Siti Miftahul
Janah, Asmiyenti Djaliasrin Djali

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jalan Raya Dukuhwaluh Purwokerto 53182
Corresponding author e-mail: binar_ad@yahoo.com

ABSTRACT

The number of postmenopausal women in the world is expected to increase to 1,200 million in 2030. The therapy which is widely used to control the symptoms of menopause are hormone replacement therapy (HRT), however HRT cause some side effects, including breast cancer. The use of phytoestrogens as a substitute for estrogen intake becomes a substitute therapy. Sunflower seeds and sesame seeds are examples of plants that have been consumed to cope with menopausal complaints. These seeds contain isoflavones, lignans and coumestan. This study was conducted to determine the estrogenic activity of sunflower seeds and sesame seeds using YES method with gene deletion PDR5, SNQ2 and YOR1. The assay was carried out using ethanol extract of sunflower seeds and sesame seeds with a series of concentrations from 50 to 2000 µg/ml with genistein as positive control. The units of β-galactosidase defined as Miller units and EC50 values were determined by using non-linear regression analysis with log dose-response parameters. The results showed that genistein and sunflower seeds resulted EC50 values $7,822 \times 10^{-15}$ M and 981.2 µg/ml, respectively, whereas the EC50 value of sesame seeds could not be determined. Sunflower seeds exhibited a weak estrogenic activity whereas the estrogenic activity of sesame seeds failed to be determined using YES method.

Keywords: *estrogenic activity, YES assay, sunflower seeds, sesame seeds*

ABSTRAK

Jumlah wanita pascamenopause di dunia diperkirakan akan bertambah menjadi 1,200 juta jiwa pada tahun 2030. Terapi yang telah luas digunakan untuk mengatasi keluhan yang terjadi akibat menopause adalah terapi penggantian hormon estrogen (*hormon replacement therapy*, HRT), namun HRT menyebabkan

Commented [N1]: 1,2 milyar

beberapa efek samping termasuk kanker payudara. Sehingga penggunaan fitoestrogen sebagai pengganti asupan estrogen menjadi pilihan. Biji bunga matahari dan biji wijen adalah contoh tanaman yang telah digunakan sebagai fitoestrogen yang dikonsumsi untuk mengatasi keluhan menopause karena mengandung senyawa isoflavon, lignan dan coumestan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas estrogenik biji bunga matahari dan biji wijen dengan menggunakan metode (YES) yang telah mengalami penghapusan gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YORI*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanol biji bunga matahari dan biji wijen dengan seri konsentrasi dari 50 hingga 2000 µg/ml dengan kontrol positif genistein. Satuan β-galaktosidase ditetapkan sebagai Miller Unit dan dengan menggunakan analisis regresi non linier dengan parameter log dosis-respon, nilai EC_{50} dapat ditentukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genistein dan biji bunga matahari menghasilkan nilai EC_{50} masing-masing sebesar $7,822 \times 10^{-15}$ M dan 981,2 µg/ml, sedangkan nilai EC_{50} biji wijen tidak dapat ditentukan. Biji bunga matahari menunjukkan aktivitas estrogenik yang lemah sedangkan aktivitas estrogenic dari biji wijen tidak dapat ditentukan dengan metode YES.

Kata kunci: aktivitas estrogenik, YES assay, biji bunga matahari, biji wijen

PENDAHULUAN

Menopause merupakan keadaan hipo-estrogenik akibat penurunan fungsi dari ovarium. Keadaan ini dapat menimbulkan perubahan pada beberapa sistem dan organ tubuh. Gejala vasomotor, atrofi urogenital, peningkatan risiko osteoporosis dan kelainan kardiovaskuler adalah gejala yang dapat timbul pada wanita menopause (Indra et al., 2009). Diperkirakan jumlah wanita pascamenopause di dunia sekitar 476 juta jiwa pada tahun 1990. Setidaknya pada tahun 2030 jumlah ini akan bertambah menjadi 1200 juta jiwa (Sastroasmoro et al., 2004).

Masa menopause dibagi menjadi tiga bagian yaitu premenopause, perimenopause, yaitu periode dengan keluhan memuncak, dan rentang waktu 1 sampai 2 tahun sebelum dan sesudah menopause, yaitu masa wanita mengalami akhir datangnya haid sampai berhenti sama sekali atau menopause (Becker et al.,

Commented [N2]: Hal ini menyebabkan

Commented [N3]: Yeast Estrogen Assay (YES)

Penggunaan singkatan untuk PERTAMA KALI, HARUS didahului dengan istilah LENGKAPnya diakhiri dengan singkatan di dalam kurung

Commented [N4]: Sedangkan nilai EC_{50} ditentukan dengan menggunakan analisis regresi non linier dengan parameter log dosis-respon

Commented [N5]: Cek kardiovaskuler atau kardiovascular ?

Commented [N6]: 1,2 milyar

2001). Menopause secara alami biasanya terjadi pada wanita berusia 48 sampai 58 tahun, namun menopause dini juga bisa terjadi pada wanita yang berusia kurang dari 40 tahun (Umland, 2008).

Keluhan yang sering dijumpai pada masa menopause berupa gejala panas (*hot flushes*), berkeringat banyak, insomnia, depresi serta perasaan mudah tersinggung. Keluhan-keluhan tersebut membuat wanita tidak nyaman akibat kekurangan hormon estrogen. Salah satu cara yang telah dilakukan untuk mengatasi keluhan tersebut adalah terapi penggantian hormon estrogen (*hormon replacement therapy*, HRT) contohnya dengan estradiol, namun cara ini selain membutuhkan biaya yang cukup besar juga memiliki efek samping yang membahayakan, salah satunya kanker payudara (Badzaid, 2003). Sehingga penggunaan bahan tanaman yang mengandung fitoestrogen menjadi pilihan terapi yang digunakan sebagai pengganti estrogen.

Commented [N7]: Oleh karena itu,

Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover et al., 2006). Studi pada manusia, hewan, dan sistem kultur sel menunjukkan bahwa fitoestrogen memainkan peran penting dalam pencegahan gejala menopause, osteoporosis, kanker, dan penyakit jantung. Konsumsi fitoestrogen menunjukkan efek estrogenik pada wanita pascamenopause (pustaka...)

Commented [N8]: Glover et al atau Glover and Assinder ?

Kelompok besar senyawa yang termasuk fitoestrogen adalah isoflavon, coumestan, dan lignan (Kurzer et al., 1997). Tumbuhan yang mengandung fitoestrogen diantaranya yaitu biji-bijian, kacang-kacangan, sayuran, dan buah-buahan termasuk biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) (Biben, 2012).

Kandungan fitoestrogen biji bunga matahari antara lain adalah lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol, coumestrol, dan daidzein (Lilian et al., 2006). *Coumestrol* merupakan komponen *coumestan* yang dapat ditemukan dalam biji wijen (*Sesamum indicum* L). Lariciresinol, pinoresinol, dan secoisolariciresinol dapat pula ditemukan dalam jumlah lebih banyak pada biji wijen (Lilian et al., 2006).

YES banyak digunakan untuk evaluasi aktivitas estrogenik dari senyawa fitoestrogen dan ekstrak dari tanaman (Zhang et al., 2005). Metode YES berdasarkan pada ekspresi reseptor estrogen manusia dan suatu elemen respon estrogen yang dihubungkan dengan gen pengatur *LacZ* dalam yeast (Routledge & Sumpter, 1996). Penghapusan gen yeast ABC transporter SNQ2 pada YES sistem menghasilkan sistem YES yang lebih sensitif (Jungsukcharoen et al., 2014). ~~Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka peneliti melaporkan potensi estrogenik biji bunga matahari dan biji wijen dengan metode YES assay dimana sistem YES yang digunakan telah melalui penghapusan gen SNQ2 dan gen yeast ABC transporter lainnya (PDR5 dan YOR1)~~

Commented [N9]: Metode YES , usahakan jangan menggunakan singkatan pada awal kalimat

Commented [N10]: Penelitian ini bertujuan untuk

METODOLOGI

Alat

Alat-alat gelas (Pyrex), *rotary evaporator* (Ika), mikropipet, kertas saring, Inkubator shaker, Sentrifus Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), Laminar air flow cabinet (Nuair), pH meter (Toa Electrics Ltd), Vorteks (Genie),

Neraca analitik (Sartorius), 96-well microplate reader (Biorad), 96-well microplate (Iwaki).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji bunga matahari dan biji wijen yang diperoleh dari toko Artomoro (Purwokerto), *Yeast Estrogen Screen (YES) system* yang mengandung reseptor estrogen manusia tipe ER- α dan telah mengalami penghapusan gen PDR5, SNQ2 dan YOR1 (strain Y190 *$\Delta pdr5\Delta snq2\Delta yor1::loxP$* +pGBT9-hER α LBD(*TRP1*) +pGAD424-hTIF2(*LEU2*)) merupakan pemberian dari Assoc. Prof. Chuenchit Boonchird (Department of Biotechnology Faculty of Science Mahidol University), etanol (Merck), 2-merkaptotanol (Bio Basic), DMSO (Merck), Genistein (Sigma), *o*NPG (*o*-nitrofenil β -D-galaktopiranosida) (Merck), sodium dihidrogen fosfat (Merck), glukosa (Merck), ekstrak *yeast* (Difco), pepton (Difco), *yeast nitrogen base* tanpa asam amino (Difco), adenin (Sigma), natrium karbonat (Merck), dan akuades.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak etanol biji bunga matahari dan biji wijen

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi yaitu serbuk kering simplisia biji bunga matahari sebanyak 500 gram dan biji wijen 300 gram ditambahkan cairan penyari etanol 70% sampai simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama 3 hari sembari diaduk. Setelah disaring kemudian dilakukan penguapan pelarut pada *rotary evaporator*.

Penentuan aktivitas estrogenik menggunakan metode YES assay

Stok dari ekstrak dibuat dalam konsentrasi 50 hingga 2000 µg/mL dalam DMSO. Senyawa standar yang digunakan yaitu genistein dengan konsentrasi 10^{-15} M hingga 10^{-3} M. Konsentrasi DMSO tertinggi pada setiap pengenceran adalah 1% dan genistein sebagai kontrol positif.

Uji dilakukan dengan melakukan inkubasi 50 µL kultur *yeast* yang telah berusia 24 jam dengan 2,5 µL ekstrak konsentrasi tertentu pada DMSO atau 50 µL DMSO (sebagai kontrol pelarut) dan 50 µL genistein (sebagai kontrol positif) dan ditambahkan 4 µL medium SD broth yang sudah ditambah dengan adenin. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dengan *shaker* selama 4 jam. Kultur sel sebanyak 150 µL dipindahkan ke 96-well microplate untuk diukur OD₆₆₀-nya. Kultur sel yang lainnya diambil 100 µL untuk disentrifuge dengan kecepatan 10,000xg lalu lisat sel dipisahkan dari supernatan. Lisat kemudian diresuspensi dalam Z-buffer 200 µL yang mengandung 0,2 mg/ml Zymolyase 100 T, dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 15 menit. Lisat sel yang dihasilkan dari sentrifugasi dan resuspensi dengan Z-buffer kemudian diinkubasi dengan 40µl/ml substrat (4 mg oNPG dalam 0,1 M sodium fosfat buffer pH 7,0) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Saat warna kuning oNPG terbentuk, 100 µL Na₂CO₃ 1 M ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Larutan sebanyak 150 µL larutan dipindahkan ke mikroplate dan baca absorbansi pada panjang gelombang 420 nm dan 550 nm.

Satuan β-galaktosidase ditetapkan sebagai Miller Unit dihitung menggunakan rumus berikut:

Commented [N11]: Menurut metode siapa atau diadopsi dari metode siapa?

Commented [f12]: Cetak miring dan dilengkapi kepanjangan SD nya

Commented [f13]: Istilah asing dicetak miring

Commented [f14]: disentrifugasi

Commented [f15]: konsisten penulisan liter menggunakan huruf l kecil atau L besar

$$Miller\ Unit = 1000 [OD_{420} - 1,75 (OD_{550})] / [OD_{660} (T) (V)] \dots(1)$$

dimana OD_{420} adalah absorbansi warna kuning dari oNP, OD_{550} adalah hamburan dari sel debris, dimana bila dikalikan dengan 1,75 mendekati hamburan sel debris pada OD_{420} . OD_{660} merupakan kepadatan sel pada awal uji, T adalah lama inkubasi waktu reaksi (menit), dan V adalah volume kultur yang digunakan pada uji (ml).

Data satuan β -galaktosidase dan EC_{50} disesuaikan dengan parameter empat model **logistic dose-respon**. Perhitungan EC_{50} dilakukan dengan menggunakan Program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA).

Commented [f16]: cetak miring (italics)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode *Yeast Estrogen Screen* (YES) secara luas digunakan untuk menentukan aktivitas estrogenik bahan kimia dan senyawa bioaktif termasuk fitoestrogen. Sistem YES yang digunakan dalam penelitian ini telah mengalami penghapusan 3 gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1* yang merupakan yeast ATP-Binding Cassette (ABC) *transporter* sehingga sistem YES yang digunakan lebih sensitif terhadap senyawa fitoestrogen (12). *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1* merupakan gen yang bertugas memompa keluar dan masuknya obat dalam yeast.

Commented [N17]: 12 ini apa? Merujuk ke mana? Pustaka no 12 kah?

Metode YES berdasar pada ekspresi reseptor estrogen yang berikatan dengan senyawa estrogenik pada elemen reseptor estrogen yang dihubungkan dengan gen pengatur *LacZ* pada yeast. Ketika senyawa estrogenik terikat pada reseptor estrogen, maka transkripsi gen pengatur *LacZ* akan teraktivasi. Aktivasi transkripsi akan menimbulkan ekspresi enzim β -galaktosidase. Dengan adanya

enzim β -galaktosidase akan mengubah *o*NPG menjadi *o*NP yang berwarna kuning dan dapat diukur absorbansinya pada OD420 nm. Satuan β -galaktosidase yang dihasilkan dari interaksi antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen pada sistem YES ditetapkan sebagai *Miller Unit*. (Pustaka.....)

Genistein pada konsentrasi 10^{-5} M menghasilkan satuan β -galaktosidase yang paling tinggi dan satuan β -galaktosidase terendah dihasilkan pada konsentrasi 10^{-15} M. Ekstrak etanol biji bunga matahari pada konsentrasi uji terendah 50 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan satuan β -galaktosidase sebesar -16,76. Namun, pada konsentrasi 800 hingga 2000 $\mu\text{g/ml}$ terjadi peningkatan hingga 221,01 Miller Unit. Satuan β -galaktosidase ekstrak etanol biji wijen menghasilkan hasil perhitungan negatif walaupun akhirnya pada konsentrasi tertinggi 2000 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh *Miller Unit* sebesar 1,89.

Satuan β -galaktosidase dan konsentrasi senyawa uji dianalisis dengan menghubungkan **variable** tersebut menggunakan **log kurva dosis-respons**. Nilai **EC_{50}** ditentukan menggunakan Program GraphPad Prism versi 4. **EC_{50}** merupakan konsentrasi efektif **dimana konsentrasi** suatu senyawa **dapat** menghasilkan 50% efek maksimal. Nilai EC_{50} yang rendah menunjukkan bahwa senyawa uji mempunyai aktivitas estrogenik yang tinggi.

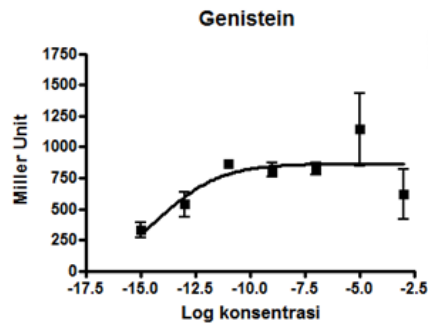
Commented [N18]: Log kurva dosis-respon atau kurva log dosis-respon

Commented [f19]: lengkapi kepanjangan EC_{50}

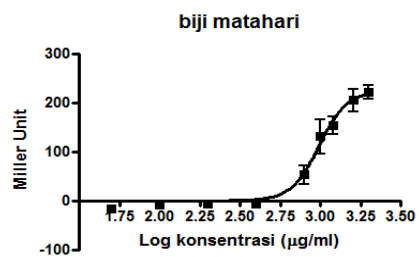
Commented [N20]: Nilai EC_{50}

Commented [f21]: Sebaiknya dihapus saja

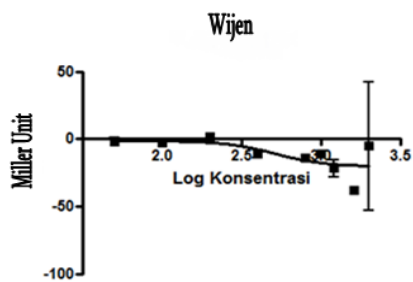
Commented [f22]: Dihapus saja



a)



b)



Gambar 1. Hubungan antara log konsentrasi a) genistein, b) ekstrak etanol biji bunga matahari, dan c) biji wijen dengan unit β -galaktosidase (Miller Unit)

Commented [N23]: Grafik tersebut menggunakan plus minus standar error atau simpangan baku ?

Berdasarkan grafik pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa nilai EC_{50} dari kontrol positif genistein adalah $7,82 \times 10^{-15}$ M. Menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Jungsukcharoen *et al.* (2014) nilai EC_{50} genistein adalah $2,8 \times 10^{-6}$ M. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif genistein memiliki aktivitas estrogenik lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini menggunakan sistem YES yang telah mengalami penghapusan gen PDR5, SNQ2 dan YOR1 sehingga sistem YES lebih sensitif dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang hanya menghapus gen SNQ2 saja.

Commented [f24]: hapus

Commented [f25]: penulisan nama gen menggunakan cetak miring (italics) agar konsisten

Nilai EC_{50} dari ekstrak etanol biji bunga matahari yaitu 981,2 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji bunga matahari memiliki aktivitas estrogenik yang rendah dimana nilai EC_{50} yang dianggap menunjukkan aktivitas yang kuat yaitu kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$, dimana semakin besar nilai EC_{50} maka aktivitas estrogenik semakin kecil. Nilai EC_{50} dari ekstrak etanol biji wijen tidak dapat ditentukan karena satuan β -galaktosidase yang dihasilkan bernilai negatif. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol wijen tidak memiliki aktivitas estrogenik.

Commented [N26]: Apakah ada pustakanya ?

Kandungan fitoestrogen dari biji wijen yang termasuk golongan senyawa lignan yaitu matairesinol, lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol hampir 40 kali lebih besar dari kandungan lignan pada biji bunga matahari (Lilian *et al.*, 2006). Namun, ternyata aktivitas estrogenik yang ditunjukkan oleh biji bunga matahari lebih tinggi dibanding dengan biji wijen bila ditentukan dengan metode YES. Hal ini dapat dijelaskan melalui dua hal yaitu pertama, lignan yang terkandung dalam tanaman merupakan prekursor lignan yang dalam tubuh manusia akan diubah menjadi enterolignan, enterodiol dan enterolakton oleh

bakteri intestinal (Lampe, 2003). Hasil ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini hanya menyari prekursor lignan tersebut, sehingga tidak dapat menunjukkan aktivitas estrogenik seperti yang terjadi ketika senyawa prekursor lignan tersebut telah dikonsumsi oleh manusia. Kedua, metode YES yang mendasarkan pada ikatan yang terjadi antara senyawa estrogenik dengan reseptor estrogen tidak mampu menunjukkan aktivitas estrogenik dari senyawa lignan yang sebenarnya. Ketidamampuan ini terjadi karena enterolignan dapat menunjukkan aktivitas estrogenik yang tidak berkaitan dengan ikatannya dengan reseptor estrogen. Dengan mengubah aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme estrogen, lignan dapat **mengubah** aktivitas biologis dari estrogen endogen (Brooks et al., 2005).

Commented [N27]: mengubah

KESIMPULAN

Ekstrak etanol biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki aktivitas estrogenik yang rendah dengan nilai EC_{50} sebesar 981,2 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol biji wijen (*Sesamum indicum* L.) tidak menunjukkan aktivitas estrogenik bila ditentukan dengan metode YES. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian penentuan aktivitas estrogenik dari enterolignan, enterodiol dan enterolakton dari biji wijen dan menggunakan metode pengujian yang tidak berdasarkan pada respon yang terjadi akibat ikatan antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen.

DAFTAR PUSTAKA

Commented [f28]: perbaiki pustaka

- Badzaid A., 2003, *Endokrinologi ginekologi, edisi ke-2*. Jakarta : KSERI
- Becker, Daniel., Jacob, Lomranz., Amos, Pines., Dov, Shmotkin., Eyal, Nitza., Galit, Bennamitay., Roberto, Mester., 2001, Psychological Distress Around Menopause. *Psychosomatics*; 42: 252-257
- Biben., A., 2012, Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi Non Reproduksi Dan Keamanan Penggunaannya, *Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami*
- Brooks JD, Thompson LU. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;94(5):461-467
- Glover A, Assinder SJ.. 2006, Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc* 189 : 565-573 (nama jurnal cetak miring atau tegak, harus konsisten sesuai dengan format jurnal ini)
- Indra, E.S., Fauzi, N., Widyani, R., 2009, Skin and Menopause - Manifestation and Treatment, *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin* 21:1. Halaman Jurnal ?
- Jungsukchareon, J., Dhiani B.A., Cherdshewasart, W., Vinayavekhin, N., Sangvanich, P., Boonchird, C., 2014. Pueraria mirifica leaves, an alternative potential isoflavonoid source, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, DOI:10.1080/09168451.2014.910091. Volume, No, halaman ?
- Kurzer, M.S., dan Xu, X., 1997, Dietary Phytoestrogens, *Annu. Rev. Nutr.* 17:353-81
- Lampe JW. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J Nutr.* 2003;133 Suppl 3:956S-964S.
- Lilian, U., Thompson., Beatrice, A., Boucher., Zhen Liu., Michelle, C., Nancy, K., 2006, Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans and coumestan, *Nutrition and Cancer* 54(2) : 184-201(nama jurnal dicetak lengkap atau singkatan, harus konsisten)
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Env Toxicol Chem*, 15(3), 241-248

Sastroasmoro, S., Soebijanto, N., Mardiaty, R., Utami, W.N., Nasrul, M., Arcan, M., *et al.*, 2004, Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause, *HTA Indonesia* : 1-39

Umland, E.M., 2008, Treatment Strategies for Reducing the Burden of Menopause-Associated Vasomotor Symptoms, *JMCP* 14: 3 (lengkapi dengan nomor halaman)

Zhang, C.Z., Wang, S. X., Zhang, Y., Chen, J. P., Liang, X. M., 2005, In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms. *J Ethnopharmacol*, 98(3), 295-300

**AKTIVITAS ESTROGENIK BIJI BUNGA MATAHARI DAN BIJI WIJEN
MENGUNAKAN METODE YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY**

***ESTROGENIC ACTIVITY OF SUNFLOWER AND SESAME SEEDS
DETERMINED BY YEAST ESTROGEN SCREEN ASSAY METHOD***

Binar Asrining Dhiani, Desi Reza Anomsari, Anna Aulia Kisti, Siti Miftahul
Janah, Asmiyenti Djaliasrin Djalil

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jalan Raya Dukuwaluh Purwokerto 53182
Corresponding author e-mail: binar_ad@yahoo.com

ABSTRACT

The number of postmenopausal women in the world is expected to increase to 1.2 billion in 2030. The therapy which is widely used to control the symptoms of menopause are hormone replacement therapy (HRT), however HRT cause some side effects, including breast cancer. The use of phytoestrogens as a substitute for estrogen intake becomes a substitute therapy. Sunflower seeds and sesame seeds are examples of plants that have been consumed to cope with menopausal complaints. These seeds contain isoflavones, lignans and coumestan. This study was conducted to determine the estrogenic activity of sunflower seeds and sesame seeds using YES method with gene deletion PDR5, SNQ2 and YOR1. The assay was carried out using ethanol extract of sunflower seeds and sesame seeds with a series of concentrations from 50 to 2000 µg/ml with genistein as positive control. The units of β-galactosidase defined as Miller units and EC50 values were determined by using non-linear regression analysis with log dose-response parameters. The results showed that genistein and sunflower seeds resulted EC50 values $7,822 \times 10^{-15}$ M and 981.2 ug/ml, respectively, whereas the EC50 value of sesame seeds could not be determined. Sunflower seeds exhibited a weak estrogenic activity whereas the estrogenic activity of sesame seeds failed to be determined using YES method.

Keywords: *estrogenic activity, YES assay, sunflower seeds, sesame seeds*

ABSTRAK

Jumlah wanita pascamenopause di dunia diperkirakan akan bertambah menjadi 1,2 milyar jiwa pada tahun 2030. Terapi yang telah luas digunakan untuk mengatasi keluhan yang terjadi akibat menopause adalah terapi penggantian hormon estrogen (*hormon replacement therapy, HRT*), namun HRT menyebabkan

beberapa efek samping termasuk kanker payudara. Hal ini menyebabkan penggunaan fitoestrogen sebagai pengganti asupan estrogen menjadi pilihan. Biji bunga matahari dan biji wijen adalah contoh tanaman yang telah digunakan sebagai fitoestrogen yang dikonsumsi untuk mengatasi keluhan menopause karena mengandung senyawa isoflavon, lignan dan coumestan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas estrogenik biji bunga matahari dan biji wijen dengan menggunakan metode *Yeast Estrogen Assay* (YES) yang telah mengalami penghapusan gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YOR1*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan ekstrak etanol biji bunga matahari dan biji wijen dengan seri konsentrasi dari 50 hingga 2000 µg/ml dengan kontrol positif genistein. Satuan β-galaktosidase ditetapkan sebagai Miller Unit sedangkan nilai EC_{50} ditentukan menggunakan analisis regresi non linier dengan parameter log dosis-respon. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genistein dan biji bunga matahari menghasilkan nilai EC_{50} masing-masing sebesar $7,822 \times 10^{-15}$ M dan 981,2 µg/ml, sedangkan nilai EC_{50} biji wijen tidak dapat ditentukan. Biji bunga matahari menunjukkan aktivitas estrogenik yang lemah sedangkan aktivitas estrogenik dari biji wijen tidak dapat ditentukan dengan metode YES.

Kata kunci: aktivitas estrogenik, YES assay, biji bunga matahari, biji wijen

PENDAHULUAN

Menopause merupakan keadaan hipo-estrogenik akibat penurunan fungsi dari ovarium. Keadaan ini dapat menimbulkan perubahan pada beberapa sistem dan organ tubuh. Gejala vasomotor, atrofi urogenital, peningkatan risiko osteoporosis dan kelainan kardiovaskuler adalah gejala yang dapat timbul pada wanita menopause (Indra et al., 2009). Diperkirakan jumlah wanita pascamenopause di dunia sekitar 476 juta jiwa pada tahun 1990. Setidaknya pada tahun 2030 jumlah ini akan bertambah menjadi 1,2 milyar jiwa (Sastroasmoro et al., 2004).

Masa menopause dibagi menjadi tiga bagian yaitu premenopause, perimenopause, yaitu periode dengan keluhan memuncak, dan rentang waktu 1 sampai 2 tahun sebelum dan sesudah menopause, yaitu masa wanita mengalami akhir datangnya haid sampai berhenti sama sekali atau menopause (Becker et al.,

2001). Menopause secara alami biasanya terjadi pada wanita berusia 48 sampai 58 tahun, namun menopause dini juga bisa terjadi pada wanita yang berusia kurang dari 40 tahun (Umland, 2008).

Keluhan yang sering dijumpai pada masa menopause berupa gejala panas (*hot flushes*), berkeringat banyak, insomnia, depresi serta perasaan mudah tersinggung. Keluhan-keluhan tersebut membuat wanita tidak nyaman akibat kekurangan hormon estrogen. Salah satu cara yang telah dilakukan untuk mengatasi keluhan tersebut adalah terapi penggantian hormon estrogen (*hormon replacement therapy*, HRT) contohnya dengan estradiol, namun cara ini selain membutuhkan biaya yang cukup besar juga memiliki efek samping yang membahayakan, salah satunya kanker payudara (Badzaid, 2003). Oleh karena itu penggunaan bahan tanaman yang mengandung fitoestrogen menjadi pilihan terapi yang digunakan sebagai pengganti estrogen.

Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen (Glover and Assinder, 2006). Studi pada manusia, hewan, dan sistem kultur sel menunjukkan bahwa fitoestrogen memainkan peran penting dalam pencegahan gejala menopause, osteoporosis, kanker, dan penyakit jantung. Konsumsi fitoestrogen menunjukkan efek estrogenik pada wanita pascamenopause (Manonai et al., 2008).

Kelompok besar senyawa yang termasuk fitoestrogen adalah isoflavon, *coumestan*, dan lignan (Kurzer et al., 1997). Tumbuhan yang mengandung fitoestrogen diantaranya yaitu biji-bijian, kacang-kacangan, sayuran, dan buah-buahan termasuk biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) (Biben, 2012).

Kandungan fitoestrogen biji bunga matahari antara lain adalah lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol, coumestrol, dan daidzein (Thompson et al., 2006). Coumestrol merupakan komponen coumestan yang dapat ditemukan dalam biji wijen (*Sesamum indicum* L). Lariciresinol, pinoresinol, dan secoisolariciresinol dapat pula ditemukan dalam jumlah lebih banyak pada biji wijen (Thompson et al., 2006).

Metode YES banyak digunakan untuk evaluasi aktivitas estrogenik dari senyawa fitoestrogen dan ekstrak dari tanaman (Zhang et al., 2005). Metode YES berdasarkan pada ekspresi reseptor estrogen manusia dan suatu elemen respon estrogen yang dihubungkan dengan gen pengatur *LacZ* dalam yeast (Routledge & Sumpter, 1996). Penghapusan gen yeast ABC transporter *SNQ2* pada YES sistem menghasilkan sistem YES yang lebih sensitif (Jungsukcharoen et al., 2014). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi estrogenik biji bunga matahari dan biji wijen dengan metode YES dimana sistem YES yang digunakan telah melalui penghapusan gen yeast ABC transporter *SNQ2*, *PDR5* dan *YORI*.

METODOLOGI

Alat

Alat-alat gelas (Pyrex), *rotary evaporator* (Ika), mikropipet, kertas saring, Inkubator shaker, Sentrifus Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), Laminar air flow cabinet (Nuaire), pH meter (Toa Electrics Ltd), Vorteks (Genie), Neraca analitik (Sartorius), 96-well microplate reader (Biorad), 96-well microplate (Iwaki).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji bunga matahari dan biji wijen yang diperoleh dari toko Artomoro (Purwokerto), *Yeast Estrogen Screen (YES) system* yang mengandung reseptor estrogen manusia tipe ER- α dan telah mengalami penghapusan gen PDR5, SNQ2 dan YOR1 (strain Y190 $\Delta pdr5\Delta snq2\Delta yor1::loxP$ +pGBT9-hER α LBD(*TRP1*) +pGAD424-hTIF2(*LEU2*)) merupakan pemberian dari Assoc. Prof. Chuenchit Boonchird (Department of Biotechnology Faculty of Science Mahidol University), etanol (Merck), 2-merkaptotanol (Bio Basic), DMSO (Merck), Genistein (Sigma), oNPG (o-nitrofenil β -D-galaktopiranosida) (Merck), sodium dihidrogen fosfat (Merck), glukosa (Merck), ekstrak *yeast* (Difco), pepton (Difco), *yeast nitrogen base* tanpa asam amino (Difco), adenin (Sigma), natrium karbonat (Merck), dan akuades.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak etanol biji bunga matahari dan biji wijen

Ekstrak dibuat dengan cara maserasi yaitu serbuk kering simplisia biji bunga matahari sebanyak 500 gram dan biji wijen 300 gram ditambahkan cairan penyari etanol 70% sampai simplisia terendam. Maserasi dilakukan selama 3 hari sembari diaduk. Setelah disaring kemudian dilakukan penguapan pelarut pada *rotary evaporator*.

Penentuan aktivitas estrogenik menggunakan metode YES assay (Boonchird et al., 2010)

Stok dari ekstrak dibuat dalam konsentrasi 50 hingga 2000 µg/mL dalam DMSO. Senyawa standar yang digunakan yaitu genistein dengan konsentrasi 10^{-15} M hingga 10^{-3} M. Konsentrasi DMSO tertinggi pada setiap pengenceran adalah 1% dan genistein sebagai kontrol positif.

Uji dilakukan dengan melakukan inkubasi 50 µl kultur *yeast* yang telah berusia 24 jam dengan 2,5 µl ekstrak konsentrasi tertentu pada DMSO atau 50 µl DMSO (sebagai kontrol pelarut) dan 50 µl genistein (sebagai kontrol positif) dan ditambahkan 4 µl medium *Synthetic Defined* (SD) cair yang sudah ditambah dengan adenin. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C dengan *shaker* selama 4 jam. Kultur sel sebanyak 150 µl dipindahkan ke *96-well microplate* untuk diukur OD₆₆₀-nya. Kultur sel yang lainnya diambil 100 µl untuk disentrifugasi dengan kecepatan 10,000xg lalu lisat sel dipisahkan dari supernatan. Lisat kemudian diresuspensi dalam Z-buffer 200 µl yang mengandung 0,2 mg/ml Zymolyase 100 T, dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 15 menit. Lisat sel yang dihasilkan dari sentrifugasi dan resuspensi dengan Z-buffer kemudian diinkubasi dengan 40µl/ml substrat (4 mg oNPG dalam 0,1 M sodium fosfat buffer pH 7,0) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Saat warna kuning oNPG terbentuk, 100 µl Na₂CO₃ 1 M ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Larutan sebanyak 150 µl larutan dipindahkan ke mikroplate dan baca absorbansi pada panjang gelombang 420 nm dan 550 nm.

Satuan β-galaktosidase ditetapkan sebagai Miller Unit dihitung menggunakan rumus berikut:

$$Miller\ Unit = 1000 [OD_{420} - 1,75 (OD_{550})] / [OD_{660} (T) (V)]$$

dimana OD₄₂₀ adalah absorbansi warna kuning dari oNP, OD₅₅₀ adalah hamburan dari sel debris, dimana bila dikalikan dengan 1,75 mendekati hamburan sel debris pada OD₄₂₀. OD₆₆₀ merupakan kepadatan sel pada awal uji, T adalah lama inkubasi waktu reaksi (menit), dan V adalah volume kultur yang digunakan pada uji (ml).

Data satuan β -galaktosidase dan EC_{50} disesuaikan dengan parameter empat model *logistic dose-response*. Perhitungan EC_{50} dilakukan dengan menggunakan Program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., USA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

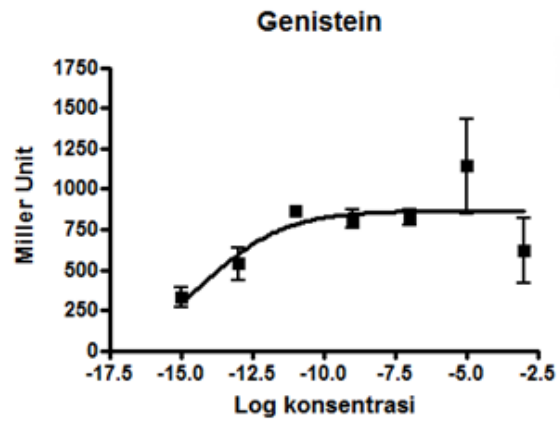
Metode *Yeast Estrogen Screen* (YES) secara luas digunakan untuk menentukan aktivitas estrogenik bahan kimia dan senyawa bioaktif termasuk fitoestrogen. Sistem YES yang digunakan dalam penelitian ini telah mengalami penghapusan 3 gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YORI* yang merupakan yeast ATP-Binding Cassette (ABC) *transporter* sehingga sistem YES yang digunakan lebih sensitif terhadap senyawa fitoestrogen (Jungsukcharoen et al., 2014). *PDR5*, *SNQ2* dan *YORI* merupakan gen yang bertugas memompa keluar dan masuknya obat dalam yeast.

Metode YES berdasar pada ekspresi reseptor estrogen yang berikatan dengan senyawa estrogenik pada elemen reseptor estrogen yang dihubungkan dengan gen pengatur *LacZ* pada yeast. Ketika senyawa estrogenik terikat pada reseptor estrogen, maka transkripsi gen pengatur *LacZ* akan teraktivasi. Aktivasi transkripsi akan menimbulkan ekspresi enzim β -galaktosidase. Dengan adanya

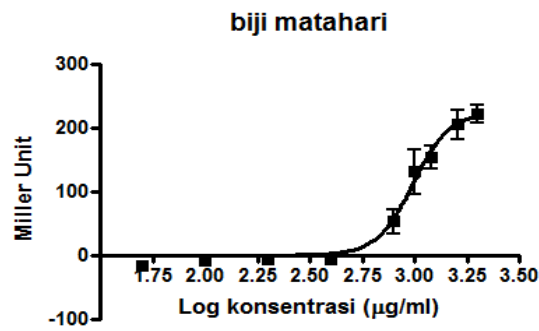
enzim β -galaktosidase akan mengubah *o*NPG menjadi *o*NP yang berwarna kuning dan dapat diukur absorbansinya pada OD420 nm. Satuan β -galaktosidase yang dihasilkan dari interaksi antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen pada sistem YES ditetapkan sebagai *Miller Unit* (Boonchird et al., 2010).

Genistein pada konsentrasi 10^{-5} M menghasilkan satuan β -galaktosidase yang paling tinggi dan satuan β -galaktosidase terendah dihasilkan pada konsentrasi 10^{-15} M. Ekstrak etanol biji bunga matahari pada konsentrasi uji terendah 50 $\mu\text{g/ml}$ menghasilkan satuan β -galaktosidase sebesar -16,76. Namun, pada konsentrasi 800 hingga 2000 $\mu\text{g/ml}$ terjadi peningkatan hingga 221,01 Miller Unit. Satuan β -galaktosidase ekstrak etanol biji wijen menghasilkan hasil perhitungan negatif walaupun akhirnya pada konsentrasi tertinggi 2000 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh *Miller Unit* sebesar 1,89.

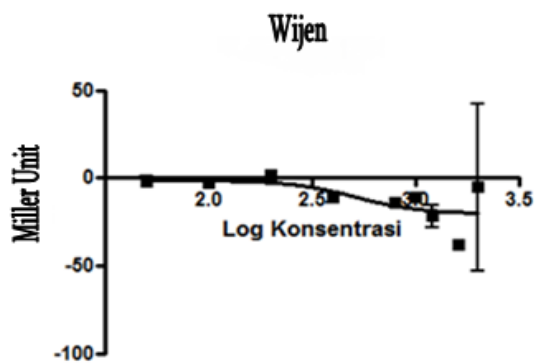
Satuan β -galaktosidase dan konsentrasi senyawa uji dianalisis dengan menghubungkan variabel tersebut menggunakan kurva log dosis-respon. Nilai *Effective Concentration 50 (EC₅₀)* ditentukan menggunakan Program GraphPad Prism versi 4. Nilai *EC₅₀* merupakan konsentrasi efektif dimana konsentrasi suatu senyawa menghasilkan 50% efek maksimal. Nilai *EC₅₀* yang rendah menunjukkan bahwa senyawa uji mempunyai aktivitas estrogenik yang tinggi.



a)



b)



Gambar 1. Hubungan antara log konsentrasi a) genistein, b) ekstrak etanol biji bunga matahari, dan c) biji wijen dengan unit β -galaktosidase (Miller

Unit) . Nilai Miller Unit didapatkan dari pengujian yang diulang sebanyak tiga kali dan dinyatakan sebagai nilai rata-rata±standard error

Berdasarkan Gambar 1. dapat dilihat bahwa nilai EC_{50} dari kontrol positif genistein adalah $7,82 \times 10^{-15}$ M. Menurut penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Jungsukcharoen *et al.* (2014) nilai EC_{50} genistein adalah $2,8 \times 10^{-6}$ M. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif genistein memiliki aktivitas estrogenik lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini menggunakan sistem YES yang telah mengalami penghapusan gen *PDR5*, *SNQ2* dan *YORI* sehingga sistem YES lebih sensitif dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang hanya menghapus gen *SNQ2* saja.

Nilai EC_{50} dari ekstrak etanol biji bunga matahari yaitu 981,2 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji bunga matahari memiliki aktivitas estrogenik yang rendah bila dibandingkan dengan nilai EC_{50} Genistein sebagai kontrol positif. Nilai EC_{50} dari ekstrak etanol biji wijen tidak dapat ditentukan karena satuan β-galaktosidase yang dihasilkan bernilai negatif. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol wijen tidak memiliki aktivitas estrogenik.

Kandungan fitoestrogen dari biji wijen yang termasuk golongan senyawa lignan yaitu matairesinol, lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol hampir 40 kali lebih besar dari kandungan lignan pada biji bunga matahari (Thompson *et al.*, 2006). Namun, ternyata aktivitas estrogenik yang ditunjukkan oleh biji bunga matahari lebih tinggi dibanding dengan biji wijen bila ditentukan dengan metode YES. Hal ini dapat dijelaskan melalui dua hal yaitu pertama, lignan yang

terkandung dalam tanaman merupakan prekursor lignan yang dalam tubuh manusia akan diubah menjadi enterolignan, enterodiol dan enterolakton oleh bakteri intestinal (Lampe, 2003). Hasil ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini hanya menyari prekursor lignan tersebut, sehingga tidak dapat menunjukkan aktivitas estrogenik seperti yang terjadi ketika senyawa prekursor lignan tersebut telah dikonsumsi oleh manusia. Kedua, metode YES yang berdasarkan pada ikatan yang terjadi antara senyawa estrogenik dengan reseptor estrogen tidak mampu menunjukkan aktivitas estrogenik dari senyawa lignan yang sebenarnya. Ketidakmampuan ini terjadi karena enterolignan dapat menunjukkan aktivitas estrogenik yang tidak berkaitan dengan ikatannya dengan reseptor estrogen. Dengan mengubah aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme estrogen, lignan dapat mengubah aktivitas biologis dari estrogen endogen (Brooks et al., 2005).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki aktivitas estrogenik yang rendah dengan nilai EC_{50} sebesar 981,2 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol biji wijen (*Sesamum indicum* L.) tidak menunjukkan aktivitas estrogenik bila ditentukan dengan metode YES. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian penentuan aktivitas estrogenik dari enterolignan, enterodiol dan enterolakton dari biji wijen dan menggunakan metode pengujian yang tidak berdasarkan pada respon yang terjadi akibat ikatan antara senyawa fitoestrogen dengan reseptor estrogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Badzaid A., 2003, Endokrinologi ginekologi, edisi ke-2. Jakarta : KSERI
- Becker D., Jacob L., Amos P., Dov S., Eyal N., Galit B., Roberto M., 2001, Psychological Distress Around Menopause, *Psychosomatics*, 42: 252-257
- Biben A., 2012, Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi Non Reproduksi Dan Keamanan Penggunaannya, Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami
- Boonchird C., Mahapanichkul T., Cherdshewasart W., 2010, Differential binding with ER α and ER β of the phytoestrogen-rich plant *Pueraria mirifica*, *Braz J Med Biol Res*, 43: 195-200
- Brooks J.D., Thompson L.U., 2005, Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94(5):461-467
- Glover A., Assinder S.J., 2006, Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression, *Jour Endoc*, 189: 565-573
- Indra E.S., Fauzi N., Widyani R., 2009, Skin and Menopause - Manifestation and Treatment, *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*, 21(1): 48-55
- Jungsukcharoen J., Dhiani B.A., Cherdshewasart W., Vinayavekhin N., Sangvanich P., Boonchird C., 2014, *Pueraria mirifica* leaves, an alternative potential isoflavonoid source, *Biosci Biotechnol Biochem*, DOI:10.1080/09168451.2014.910091., 78(6): 917-926
- Kurzer M.S., Xu X., 1997, Dietary Phytoestrogens, *Annu Rev Nutr*, 17:353-381
- Lampe J.W., Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers, 2003, *J Nutr*, 133(Suppl 3): 956S-964S
- Manonai J., Chittacharoen A., Udomsubpayakul U., Theppisai H., Theppisai U., 2008, Effects and safety of *Pueraria mirifica* on lipid profiles and biochemical markers of bone turnover rates in healthy postmenopausal women, *Menopause*, 15(3): 530-535
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Env Toxicol Chem*, 15(3): 241-248

- Sastroasmoro, S., Soebijanto, N., Mardiaty, R., Utami, W.N., Nasrul, M., Arcan, M., et al, 2004, Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause, HTA Indonesia : 1-39
- Thompson L.U., Boucher B.A., Liu Z., Cotterchio M., Kreiger N., 2006, Phytoestrogen Content of Foods Consumed in Canada, Including Isoflavones, Lignans and Coumestan, Nutr Cancer, 54(2) : 184-201
- Umland, E.M., 2008, Treatment Strategies for Reducing the Burden of Menopause-Associated Vasomotor Symptoms, J Manag Care Pharm, 14(3 Suppl): 14-9
- Zhang, C.Z., Wang, S. X., Zhang, Y., Chen, J. P., Liang, X. M., 2005, In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms, J Ethnopharmacol, 98(3): 295-300