

AKTIVITAS ANTIOSTEOPOROSIS FRAKSI n-HEKSANA DAUN *Marsilea crenata* Presl. DALAM MENINGKATKAN KEPADATAN TULANG TRABEKULAR VERTEBRA MENCIT BETINA

Antiosteoporotic Activity of n-Hexane Fraction From *Marsilea crenata* Presl. Leaves in Increasing Trabecular Vertebrae Bone Density of Female Mice

Mangestuti Agil¹⁾, Burhan Ma'arif^{2*)}, Nyimas Yusma Aemi¹⁾,

¹Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

²Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia.

*e-mail: burhan.maarif@farmasi.uin-malang.ac.id

ABSTRACT

Marsilea crenata Presl. is a typical plant in East Java, Indonesia which suspected contains estrogen-like substances. The present study aimed to investigate phytoestrogen stimulating activity of *M. crenata* leaves in increasing trabecular vertebrae bone density on osteoporosis female mice. Dexamethasone treatment (0,0029 mg/20gBW/day) was demonstrated to facilitate the induction of osteoporosis. Mice were divided into five groups, each 6 mice: negative control, mice were given CMC Na 0,5% 0,4ml/20gBB/day; positive control, mice were given alendronate 0,026 mg/20gBW/day; treated groups, mice were given the n-hexane fraction of *M. crenata* on three different concentration, 1.54 mg/20gBW/day, 1.54 mg/20gBW/day combined with physical exercise, and 3.08 mg/20gBW/day. The result showed trabecular vertebrae thickness of each groups are $5.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ (negative group), $8.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (positive group), $6.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (fraction of n-hexane at dose 1.54 mg/20gBW), $8.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ (fraction of n-hexane at dose 1.54 mg/20gBW combined with physical exercise), and $8.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (fraction of n-hexane at dose 3.08 mg/20gBW). Based on these results, the treatment of *M. crenata* n-hexane fraction have the activity in increasing trabecular vertebrae bone density on female mice, with the optimal dose 1.54 mg/20gBW combined with physical exercise and 3.08 mg/20gBW. This activity is probably due to phytoestrogens content in n-hexane fraction of *M. crenata* leaves, that can replace the function of estrogen in its bond with ER inside the bone.

Keywords: *Marsilea crenata* Presl., osteoporosis, phytoestrogen

ABSTRAK

Marsilea crenata Presl. Atau dikenal dengan semanggi merupakan salah satu tanaman khas Jawa Timur, Indonesia yang diduga mengandung *estrogen-like substance*. Tujuan penelitian ini untuk mengkaji aktivitas fitoestrogen daun semanggi dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra mencit betina. Perlakuan deksametason 0,0029 mg/20gBB/hari diberikan untuk menginduksi terjadinya osteoporosis pada mencit. Mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan masing-masing 6 ekor mencit yaitu: kontrol negatif, diberikan CMC Na 0,5% 0,4ml/20gBB/hari;

kontrol positif, diberikan alendronate 0,026 mg/20gBB/hari); perlakuan, diberikan fraksi n-heksana *M. crenata* pada tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 1,54 mg/20gBB/hari, 1,54 mg/20gBB/hari dikombinasikan dengan latihan fisik, dan 3,08 mg/20gBB/hari. Hasil penelitian menunjukkan ketebalan trabekular vertebra masing-masing kelompok, yaitu: $5,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (kelompok kontrol negatif), $8,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (kelompok kontrol positif), $6,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (fraksi n-heksana pada dosis 1,54 mg/20gBB), $8,1 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (fraksi n-heksana pada dosis 1,54 mg/20gBB dikombinasikan dengan latihan fisik), dan $8,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (fraksi n-heksana pada dosis 3,08 mg/20gBB). Berdasarkan hasil penelitian semua dosis fraksi n-heksana semanggi mempunyai aktivitas dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra mencit betina, dengan dosis optimum 1,54 mg/20gBB dikombinasikan dengan latihan fisik dan dosis 3,08 mg/20gBB. Aktivitas ini terjadi kemungkinan karena kandungan fitoestrogen pada fraksi n-heksana daun semanggi, yang menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan ER di dalam tulang.

Kata kunci: *Marsilea crenata* Presl., osteoporosis, fitoestrogen

PENDAHULUAN

Pascamenopause merupakan suatu tahapan biologis yang terjadi sebagai bagian dari proses penuaan pada wanita dan berdampak pada terjadinya defisiensi estrogen (Lee *et al.*, 2013). Wanita pascamenopause seringkali mengalami berbagai masalah kesehatan akibat defisiensi estrogen, dan salah satu dampak yang sering dijumpai adalah osteoporosis (Villiers *et al.*, 2009). Osteoporosis merupakan suatu keadaan dengan karakteristik penurunan massa tulang disertai kerusakan mikroarsitektur tulang yang menyebabkan peningkatan resiko terjadinya fraktur (Villiers, 2009; Lee *et al.*, 2013).

Hormone replacement therapy (HRT) adalah jenis pengobatan yang paling banyak diresepkan bagi wanita pascamenopause di negara-negara maju (Rachman *et al.*, 2004). Pemberian HRT dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang potensial seperti *coronary event*, *venous thromboembolism*, stroke, kanker payudara, dan demensia (Lee *et al.*, 2013). Fitoestrogen kemudian muncul sebagai sumber pengobatan alternatif untuk defisiensi estrogen. Fitoestrogen relatif lebih mudah didapat dengan efek samping minimal, dan dapat menggantikan fungsi estrogen dalam menjaga homeostasis tubuh (Villiers, 2009), sehingga merupakan alternatif pengobatan bagi wanita pascamenopause yang potensial (Yang *et al.*, 2012).

Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) merupakan salah satu tanaman yang terkenal di Surabaya, Jawa Timur sebagai makanan khas masyarakat setempat. Semanggi diketahui memiliki kandungan fitoestrogen (Yacoeb *et al.*, 2010; Laswati, 2011). Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap semanggi menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun semanggi dapat menghambat terjadinya osteoporosis pada wanita pascamenopause dengan mekanisme peningkatan proses pembentukan tulang (Laswati, 2011). Penelitian secara *in silico* senyawa-senyawa pada daun semanggi memiliki afinitas yang tinggi terhadap ER- β , sedangkan pada pengujian *in vitro* terhadap sel preosteoblas MC3T3-E1 menunjukkan ekstrak n-heksana dan fraksinya dapat meningkatkan proses proliferasi dan diferensiasi sel preosteoblas MC3T3-E1 (Ma'arif *et al.*, 2018). Fraksi etil asetat daun semanggi juga dapat meningkatkan kepadatan

tulang trabekular vertebra serta tulang femur pada uji *in vivo* pada mencit betina (Adityara, 2017; Widiyanti, 2017).

Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui aktivitas fraksi *n*-heksana ekstrak etanol 96% daun semanggi dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason sebagai model osteoporosis.

METODE

Daun semanggi didapatkan dari daerah Benowo, Surabaya, Indonesia pada bulan November 2017, dan diidentifikasi di UPT Materia Medica, Batu, Indonesia pada bulan Desember 2017 dengan nomor spesimen 1a-17b-18a-1. Daun semanggi kemudian dikeringkan dan diserbuk sehingga diperoleh serbuk kering berwarna hijau.

Mencit diperoleh dari Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Universitas Airlangga Surabaya. Mencit yang digunakan berupa mencit betina dewasa berumur 70-80 hari dengan kondisi badan sehat secara pengamatan visual, mempunyai berat badan antara 20-30 g.

Etanol 70% (Merck), deksametason (Kimia Farma), alendronate (Novel), CMC Na 0,5% dan kloroform (Merck) didapatkan dari Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Universitas Airlangga Surabaya. Formalin 10%, asam format 10%, alkohol 70%, asam nitrat 3%, aseton, xilol 1,5%, parafin cair, gliserin, larutan amonia, pewarna hematoxylin dan eosin diperoleh dari Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya.

Serbuk daun semanggi dimaserasi menggunakan penyari etanol 96% dengan rasio 1:20, lalu disaring dan diuapkan untuk mendapatkan ekstrak etanol 96%. Ekstrak kemudian disuspensikan dengan air, lalu dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan *n*-heksana dengan rasio 1:1 dalam corong pisah. Fase *n*-heksana kemudian diuapkan untuk mendapatkan fraksi *n*-heksana daun semanggi.

Uji aktivitas peningkatan kepadatan tulang dilakukan pada mencit betina yang diinduksi deksametason 0,0029 mg/20gBB/hari *p.o* selama 4 minggu, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri 6 ekor, yaitu: kelompok kontrol negatif diberikan suspensi CMC Na 0,5% 0,4ml/20gBB/hari; kelompok kontrol positif diberikan suspensi alendronate 0,026 mg/20gBB/hari; kelompok perlakuan 1 dengan suspensi fraksi *n*-heksana daun semanggi dosis 1,54 mg/20gBB/hari; kelompok perlakuan 2 dengan suspensi fraksi *n*-heksana daun semanggi dosis 1,54 mg/20gBB/hari dengan latihan fisik menggunakan *treadmill* 5 m/menit selama 15 menit 3 kali dalam seminggu; kelompok perlakuan 3 dengan suspensi fraksi *n*-heksana daun semanggi dosis 3,08 mg/20g/hari. Perlakuan diberikan *p.o* selama 4 minggu dengan volume pemberian 0,4ml/20gBB/hari.

Pemeriksaan histomorfometri tulang dilakukan pada preparat tulang trabekular vertebra, di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Tulang trabekular vertebra dipotong dan dimasukkan ke dalam formalin 10% untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan dekalsifikasi (7,0 g aluminium klorida, 8,5 g asam klorida, dan 5,0 ml asam format dalam 100 ml air) dan diuji kepadatannya. Netralisasi kemudian dilakukan dengan merendam tulang dalam natrium sulfat 2% selama 24 jam. Tulang vertebra trabekular kemudian dicuci menggunakan air selama 12 jam dan dibilas dengan alkohol 70%. Tulang kemudian diblok dengan parafin dan dipotong dengan mikrotom. Langkah selanjutnya adalah hidrasi dengan 70% alkohol dan hematoxylin sebagai pewarna utama. Tulang dimasukkan dalam alkohol asam 1% dan larutan amonia, lalu ditambahkan 1% eosin. Langkah terakhir dilakukan pembersihan tulang dengan 1,5% xilol sebelum di preparasi pada objek kaca. Slide pengamatan dianalisis menggunakan program

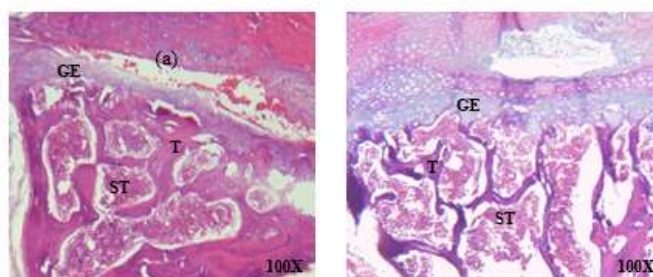
Olympus Cellsens dengan zoom 100x. Mikroskop yang digunakan pada pengamatan dihubungkan pada komputer dan *motic image software*, untuk kemudian dihitung ketebalannya (dalam μm).

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *One Way-Analysis of variance (One Way Anova)* pada $\alpha=0,05$ dengan SPSS. Bila ada perbedaan yang bermakna maka uji statistik dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* metode *least significant difference (LSD)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada proses ekstraksi dan fraksinasi didapatkan rendemen ekstrak sebesar 19,2% dan fraksi n-heksana sebesar 12,3%. Ekstraksi cair-cair berfungsi untuk memisahkan fraksi berdasarkan tingkat polaritasnya. Fraksinasi dengan n-heksana bertujuan untuk mendapatkan senyawa-senyawa bersifat nonpolar yang termasuk dalam fitoestrogen, seperti triterpenoid.

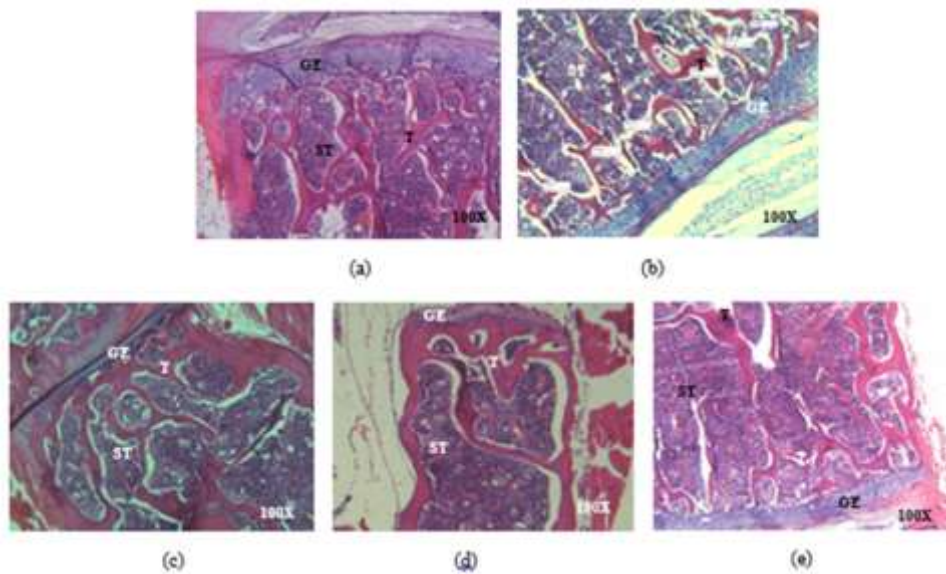
Pengamatan histomorfometri nilai ketebalan tulang trabekular vertebra mencit betina dilakukan dengan menarik garis yang mengikuti arah garis epifisis pada tulang trabekula, di daerah metafisis dekat dengan garis epifisis. Hasil pengamatan pengukuran histomorfometri pada mencit betina tanpa perlakuan maupun mencit betina yang diberi perlakuan deksametason dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Histomorfologi tulang trabekular vertebra mencit betina (perbesaran 100x; GE=garis epifisis; T=tulang trabekular; ST=sumsum tulang). (a) Tulang normal; (b) Tulang yang diinduksi deksametason

Hasil perhitungan histomorfometri menunjukkan perlakuan deksametason menyebabkan ketebalan tulang rerata menjadi 5,0 μm , sedangkan pada mencit betina normal tanpa perlakuan ketebalan tulang 11,2 μm . Deksametason merupakan salah satu kortikosteroid sintetis. Induksi obat ini selama empat minggu untuk mencit, sama dengan induksi selama 3-4 tahun untuk manusia (Noor, 2014). Penggunaan senyawa kelompok kortikosteroid untuk jangka panjang (3-6 bulan, atau lebih) dapat menyebabkan terhambatnya proses pembentukan tulang (Kementerian Kesehatan RI, 2015; Laswati *et al.*, 2015). Penggunaan glukokortikoid untuk jangka panjang juga dapat mengurangi kadar hormon estrogen dan progesteron, sedangkan defisiensi estrogen sendiri dianggap sebagai salah satu faktor yang menyebabkan ketidakseimbangan proses remodeling tulang dan memiliki peran dalam meningkatkan proses penyerapan tulang (Gong *et al.*, 2008).

Hasil pengamatan uji aktivitas fraksi n-heksana daun semanggi dalam meningkatkan kepadatan tulang dapat dilihat pada Gambar 2.



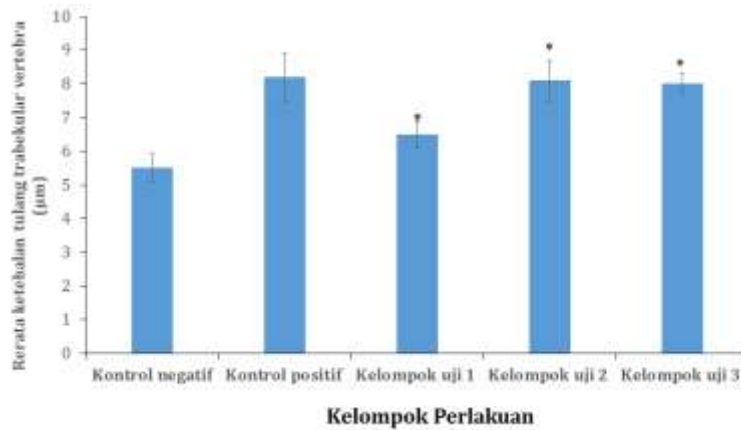
Gambar 2. Histomorfologi tulang trabekular vertebra (perbesaran 100x; GE=garis epifisis; T=tulang trabekular; ST=sumsum tulang). (a) kontrol positif (alendronat); (b) kontrol negatif (CMC-Na); (c) fraksi *n*-heksana dosis 1,54mg/20gBB; (d) fraksi *n*-heksana dosis 1,54mg/20gBB dan latihan fisik; (e) fraksi *n*-heksana dosis 3,08mg/20gBB.

Preparat tulang trabekular vertebra kemudian dilakukan perhitungan histomorfometri sehingga diperoleh nilai ketebalan tulang, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai ketebalan tulang trabekular vertebra mencit betina (μm)

No.	Kelompok perlakuan	Nilai ketebalan tulang trabekular vertebra tiap mencit (μm)					Rerata \pm SD
1.	Kontrol positif (alendronat)	8,2	7,8	8,0	8,9	7,9	8,2 \pm 0,4
2.	Kontrol negatif (CMC-Na)	4,8	5,8	5,2	5,0	6,6	5,5 \pm 0,7
3.	Kelompok uji 1 (fraksi <i>n</i> -heksana dosis 1,54mg/20gBB)	6,5	6,0	6,4	6,9	6,9	6,5 \pm 0,4
4.	Kelompok uji 2 (fraksi <i>n</i> -heksana dosis 1,54mg/20gBB dan latihan fisik)	8,5	7,3	7,7	8,9	8,0	8,1 \pm 0,6
5.	Kelompok uji 3 (fraksi <i>n</i> -heksana dosis 3,08mg/20gBB)	8,3	7,6	8,0	8,1	7,9	8,0 \pm 0,3

Hasil One-way ANOVA menunjukkan level signifikan (p)=0,000 atau kurang dari 0,05. Dari hasil uji tersebut dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan minimal satu pasang kelompok perlakuan. Untuk mengetahui adanya perbedaan dalam kelompok perlakuan dilakukan uji *Post Hoc Test* metode LSD. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan semua kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan 1 dengan dosis 1,54 mg/20gBB/hari memiliki nilai yang berbeda signifikan terhadap semua kelompok perlakuan, kontrol negatif maupun kontrol positif. Kelompok perlakuan 2 dengan dosis 1,54 mg/20gBB/hari dikombinasikan dengan latihan fisik, memiliki nilai yang tidak berbeda signifikan terhadap kelompok perlakuan 3 dengan dosis 3,08 mg/20gBB/hari maupun kontrol positif, namun memiliki nilai yang berbeda signifikan terhadap kontrol negatif dan kelompok perlakuan 1 (Gambar 3).



Gambar 3. Grafik rata-rata nilai ketebalan trabekular vertebra dalam berbagai kelompok, * = $p < 0,005$ dibandingkan dengan kontrol negatif

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan nilai kepadatan tulang trabekular vertebra menit betina dengan pemberian fraksi n-heksana daun semanggi, dengan hasil optimum terjadi pada pemberian kelompok perlakuan 2 dengan dosis 1,54 mg/20gBB mencit/hari dikombinasikan dengan latihan fisik dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis 3,08 mg/20gBB/hari. Hasil kedua kelompok tersebut bahkan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif.

Pada tulang terdapat reseptor estrogen alpha dan beta ($ER\alpha$ dan $ER\beta$), yang memiliki peran dalam mempertahankan homeostasis kepadatan tulang. Pada keadaan defisiensi estrogen yang disebabkan oleh induksi deksametason, tidak ada estrogen yang berikatan dengan ER. Hal ini menyebabkan sitokin pro-osteoklastogenesis seperti *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1) dan *Interleukin-6* (IL-6) diproduksi dalam jumlah tinggi. Produksi sitokin ini akan menginduksi diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas dewasa, dan akan terjadi proses penyerapan tulang secara masif. Selain itu, peningkatan sitokin juga akan menghambat diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblas dewasa, yang menyebabkan penghambatan proses pembentukan tulang. Sementara itu, defisiensi estrogen juga menyebabkan penurunan *Tumor Growth Factor- β* (TGF- β), *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), dan *Insulin-like Growth Factor-2* (IGF-2) dalam jumlah tinggi. Menurunnya faktor pertumbuhan dapat meningkatkan osteoklastogenesis dan menghambat osteoblastogenesis, sehingga osteoporosis dapat terjadi (Kawiyana, 2009; Kini and Nandeesh, 2012; Meeta, 2013).

Pada penelitian ini, daun semanggi dapat meningkatkan kepadatan tulang trabekular vertebra mencit betina kemungkinan karena kandungan fitoestrogen pada fraksi n-heksana. Senyawa fitoestrogen berikatan dengan ER di dalam sel inti dan melindungi situasi yang terjadi pada defisiensi estrogen (Yang *et al.*, 2012). Ikatan fitoestrogen dengan ER menyebabkan penurunan osteoklastogenesis dan resorpsi tulang, serta peningkatan osteoblastogenesis dan pembentukan tulang (Laswati *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Pemberian fraksi n-heksana daun semanggi dosis 1,54 mg/20gBB, 1,54 mg/20 g BB disertai latihan fisik serta dosis 3,08 mg/20gBB dapat meningkatkan kepadatan tulang vertebra pada mencit betina yang diinduksi deksametason. Dosis optimum adalah 1,54 mg/20gBB disertai latihan fisik, dan 3,08 mg/20g BB. Aktivitas ini dapat terjadi dimungkinkan karena kandungan fitoestrogen pada fraksi n-heksana daun semanggi yang dapat menggantikan fungsi estrogen dalam ikatannya dengan ER di dalam tulang.

DAFTAR PUSTAKA

- Adityara, R. A. (2017). Pengujian aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula femur mencit betina. *Skripsi: Universitas Airlangga*.
- Gong, H., Jarzynka, M. J., Cole, T. J., Lee, J. H., Wada, T., Zhang, B., *et al.* (2008). Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Res.*, 68, 7386-93.
- Kawiyana, I. K. S. (2009). Osteoporosis Patogenesis Diagnosis dan Penanganan Terkini. *Jurnal Penyakit Dalam*, 10(2), 157-69
- Kementerian Kesehatan R.I. (2015). *Indofatin Data dan Kondisi Penyakit Osteoporosis di Indonesia*. Pusat data dan Informasi Kemenkes RI, Jakarta.
- Kini, U. and Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer (pp 29-57).
- Laswati, H. (2007). Kombinasi Latihan Fisik dan Pemberian Daun Semanggi Menghambat Peningkatan Ketidakseimbangan Proses Remodelling Tulang Perempuan Pascamenopause Melalui Peran Reseptor Estrogen Sel Osteoblast. *Disertasi*, Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Laswati, H. (2011). Green Clover Potentiates Delaying the Increment of Imbalance Bone Remodeling Process in Postmenopausal Women. *Folia Medica Indonesiana*, 47(2), 112-17.
- Laswati, H., Agil, M., Widyowati, R. (2015). Effect of *Spilanthes acmela* and Exercise on Osteoblast Cells Femur in Mice Dexamethasone Induced. *Media Litbangkes*, 25(1), 43-50.
- Lee, C. A. and Thomas A. E., (2001). *The Bone Organ System Form And Function in Osteoporosis 2nd Vol. 1*. Stanford. Academic Press
- Lee, W. L., Tsui, K. H., Seow, K. M., Cheng, M. H., Su, W. H., Chen, C. P., Wang, P. H. (2013). Hormone therapy for postmenopausal women and unanswered issue. *Gynecology and Minimally Invasive Therapy*, 2(1), 13-17
- Ma'arif, B., Agil, M., dan Laswati, H. (2018). Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(3), 55-59.
- Meeta (2013). *Postmenopause Osteoporosis basic and Clinical Concepts* (pp 20-22). Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi.
- Noor, Z. (2014). *Buku Ajar: Osteoporosis Patofisiologi dan Peran Atom Mineral dalam Manajemen Terapi*. Salemba Medika, Jakarta.
- Rachman, I. A., Soewondo, P., Setiati, S., Kusumawijaya, K., Baziad, A., Witjaksono, J., Sukarya, W. S., Silvia. (2004). *Terapi Sulih Hormon pada Wanita Perimenopause*. HTA Indonesia.
- Villiers, T. J. (2009). Bone health and osteoporosis in postmenopausal women. *Elsevier: Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 23, 73-85.
- Widiasari, F. A. (2017). Pengujian aktivitas antiosteoporosis fraksi etil asetat daun *Marsilea crenata* Presl. dalam meningkatkan kepadatan tulang trabekula vertebra mencit betina. *Skripsi. Universitas Airlangga*.
- Yacoeb, A. M., Nurjanah, Arifin, M., Sulistiono, W., Kristiono, S. S. (2010). Deskripsi histologis dan perubahan komposisi kimia daun dan tangkai semanggi (*Marsilea crenata* Presl., Marsileaceae) akibat perebusan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. XII(2), 81-95.
- Yang, T. S., Wang, S. Y., Yang, Y. C., Su, C. H., Lee, F. K., Chen, S. C., Tseng, C. Y., Jou, H. J., Huang, J. P., Huang, K. E. (2012). Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 51(2), 229-35.