

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KLABET (*TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L.*) TERHADAP KADAR HORMON ESTRADIOL DAN FSH PLASMA TIKUS PUTIH BETINA GALUR WISTAR PREPUBERTAL

Kurnia Agustini, Sumali Wiryowidagdo*, Dadang Kusmana**

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT.

*Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia.

**Departemen Biologi, FMIPA Universitas Indonesia.

ABSTRACT

Biji Klabet or Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) contains steroidal saponin such as diosgenin, tigogenin, gitogenin, yamogenin and trigoneoside, that are suspected having an estrogen-like effect or as phytoestrogen. The objective of this study was to evaluate the estrogen-like effect of biji klabet alcohol extracts. This research used immature Wistar female rats, age of 19 day, which were represent the climacteric/menopause phase. The testing animals were divided into five groups, namely normal group, estradiol control group and three level dose groups of fenugreek extract (30 mg/200gBW; 60mg/200gBW and 120mg/200gBW). The result showed that on 120mg/200gBW fenugreek extract significantly ($\alpha=0.05$) increased estradiol and FSH level on immature rat. Analysis of vaginal smear showed vaginal lubrication effect, surprisingly on 120mg/200gBW could induce estrous cycle.

Keyword : Biji Klabet, estrogen-like effect, phytoestrogen, *Trigonella foenum graecum L.*

PENDAHULUAN

Biji klabet atau *Foenigraeci semen* (Fenugreek) adalah biji yang dikeringkan dari tanaman *Trigonella foenum-graecum L.* suku Leguminosae, berasal dari India dan Maroko, dan kini telah dibudidayakan di Lembang, Jawa Barat (MMI, 1979). Biji Klabet diduga memiliki potensi efek estrogenik (fitoestrogen) pada tubuh karena kandungan beberapa saponin steroidnya yaitu diosge-

nin, yang merupakan prekursor pembentukan hormon seks (Evans, 2002), isomernya yaitu yamogenin (Dewick, 1997), gitogenin dan tigogenin, serta trigoneosida (saponin steroid mirip estrogen) yang memiliki efek terapi pada simptom menopause, diabetes mellitus serta hiperkolesterolemia (Hoffman, 2004). Kandungan diosgeninnya terdapat dalam bentuk basa bebas 0,8-2,2% (Wiryowidagdo, 2000).

Corresponding author : E-mail : kurnia_atini@yahoo.com.

Fitoestrogen merupakan salah satu alternatif pengganti Terapi Sulih Hormon (TSH), suatu pengobatan keluhan masa menopause yang dilakukan dengan cara pemberian hormon estrogen eksternal. Akan tetapi efek samping dari TSH ini juga banyak, diantaranya nyeri payudara, peningkatan berat badan, keputihan, sakit kepala, perdarahan pada vagina dan peningkatan kejadian kanker payudara. Mengingat banyaknya kendala TSH karena harus digunakan jangka panjang dan harga yang relatif mahal, maka perlu dicari alternatif lain sebagai pengganti TSH yang dapat memenuhi kriteria efektif, murah, alami (berasal dari tanaman), aman dan dapat diterima oleh wanita menopause, yaitu fitoestrogen yang banyak ditemukan pada beberapa tanaman obat Indonesia (Badziad, 2003).

Ketidakteraturan dalam siklus menstruasi wanita biasanya terjadi pada usia 40-50 tahun, ditandai dengan tidak terjadinya ovulasi selama beberapa siklus menstruasi. Setelah beberapa bulan sampai beberapa tahun, siklus berhenti sama sekali, disebut masa menopause. Produksi hormon estrogen oleh ovarium menurun dengan sangat drastis, sehingga tidak lagi dapat menghambat pembentukan hormon perangsang folikel (*Folicle Stimulating Hormone/FSH*) dan hormon luteinisasi (*Luteinizing Hormone/LH*) yang cukup untuk menyebabkan ovulasi (Guyton, 1995). Akibat perubahan hormonal yang drastis ini menimbulkan banyaknya

keluhan masa menopause, seperti keluhan vasomotorik, keluhan fisiologis dan psikologis. Keluhan yang muncul paling sering adalah *hot flushes* (semburan panas pada daerah-daerah tertentu seperti dada, leher dan kepala), kerusakan kulit, gangguan sistem urogenital, gangguan libido, hiperkolestolemia dan osteoporosis (Badziad, 2003).

Dalam rangka pengembangan fitofarmaka fitoestrogen dari tanaman asli Indonesia, maka perlu kiranya dilakukan penelitian praklinik dan klinik. Pengujian khasiat ini bertujuan untuk mengetahui efek estrogenik dari pemberian ekstrak biji klabet sebagai salah satu sumber fitoestrogen. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah kadar hormon estradiol dan *Folicle Stimulating Hormone (FSH)* plasma, serta gambaran preparat apusan vagina. Parameter tersebut diharapkan dapat memberikan informasi yang saling menunjang untuk mengetahui efek estrogenik dari biji klabet.

BAHAN DAN CARA KERJA

BAHAN

Simplisia Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L) dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Solo dan telah dideterminasi di Lembaga Herbarium Bogoriense LIPI, Bogor. Ekstrak etanol biji klabet. Sediaan pembanding estradiol, Lynarol[®]. Hewan uji tikus putih betina galur Wistar berusia 19 hari

dengan induk berasal dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Puslitbang Gizi FK-UI), Jakarta. Bahan pembuatan preparat apusan vagina (*cotton swab*, gelas obyek, larutan NaCl fisiologis, metanol, larutan pewarna Giemsa). Pereaksi analisis kadar hormon estradiol dan FSH metode *Radioimmunoassay* (RIA): *Coat.A.Count*[®] Estradiol-IRMA dan *Coat.A.Count*[®] FSH-IRMA.

ALAT

Homogenizer Heidolph[®], *rotary evaporator* Heidolph[®]. Alat perlakuan hewan uji (kandang hewan uji, timbangan hewan, timbangan analitik, sonde lambung, pipa kapiler, pipet gelas, alat gelas, peralatan bedah). Mikroskop dilengkapi kamera Olympus[®]. *Hetrich Zentrifugen*[®], Mikro 22R. Alat analisa hormon (mikropipet, *Vortex mixer*, *rack shaker*, *foam decanting rack*, *Gamma counter*).

TEMPAT PENELITIAN

Pembuatan ekstrak uji dan perlakuan hewan uji dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, Kawasan PUS-PIPTEK Serpong, Tangerang. Sedangkan analisa kadar hormon estradiol dan FSH dilakukan di Laboratorium Analisis *Radioimmunoassay*, Balai Penelitian Ternak, Tapos, Ciawi.

CARA KERJA:

Pembuatan Ekstrak Uji

Simplisia diekstraksi dengan

menggunakan pelarut etanol destilat 96%.

Perlakuan ekstrak uji

Tikus betina prepubertal dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan secara acak, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor, yaitu:

Kelompok I (N) :

Kelompok normal, perlakuan CMC Na 0,5%

Kelompok II (KE2) :

Kelompok kontrol estradiol 0,9µg/200gBB

Kelompok III (D1) :

Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 1 (30 mg/200gBB)

Kelompok IV (D2) :

Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 2 (60 mg/200gBB)

Kelompok V (D3) :

Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 3 (120 mg/200gBB)

Pemberian ekstrak uji secara oral, satu kali sehari, selama 16 hari berturut-turut. Pada hari ke-13 sampai hari ke-17, dilakukan analisis apusan vagina. Pada hari ke-17, seluruh hewan coba diambil darahnya untuk analisis kadar hormon.

Analisis Preparat Apusan Vagina (Martin, et.al, 1990; Turner, 1971)

Preparat apusan vagina dibuat dengan cara mengoleskan kapas (*cotton swab*) yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9% ke dalam vagina tikus. Preparat dibuat setipis mungkin dan diberi pewarnaan Giemsa,

selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

Analisis Kadar Hormon

Plasma darah hewan uji dianalisis kadar hormon estradiol dan FSH dengan menggunakan reagen diagnostika metode *Radioimmunoassay* (RIA). Pencacahan *Total Count* dari *tracer* radioaktif ^{125}I FSH dan *tracer* radioaktif ^{125}I FSH dilakukan dengan cara mengisi tabung yang telah dilapisi antibodi (*Coated tubes*) dengan masing-masing cairan *tracer* radioaktif, kemudian dicacah dengan menggunakan *Gamma counter*. Pengukuran dilakukan dua kali (duplo).

Pengolahan data

Data kuantitatif yang diperoleh dari pengukuran kadar estradiol plasma dan kadar FSH plasma dianalisis secara statistik menggunakan program komputer *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 11,5 for windows* dengan pendekatan uji nilai probabilitas (P). Hasil uji disimpulkan dengan cara membandingkan nilai taraf nyata (α) dengan P yang diperoleh melalui komputasi SPSS (Sulaiman, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan model hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina prepubertal yang berusia 19 hari, sehingga belum ada produksi estrogen oleh ovarium. Pada kondisi ini

diperkirakan tikus belum memiliki siklus hormonal yang normal. Hal ini dapat dilihat dari preparat apusan vagina tikus pada kelompok normal prepubertal. Pada preparat tersebut tidak terdapat tiga jenis sel (sel epitel, sel yang terkornifikasi dan sel leukosit) yang biasa ada pada lapisan mukosa vagina tikus betina dewasa (Tabel 2). Secara umum, tikus putih betina baru bisa dikawinkan dengan jantannya pada usia 10 minggu atau 70 hari (Smith, 1998). Model hewan uji ini diharapkan dapat mewakili kondisi menopause, yaitu suatu keadaan dimana kadar estrogen tubuh sangat rendah (Kanno, 2001). Pada empat hari terakhir perlakuan ekstrak uji dilakukan analisis apusan vagina untuk mengetahui efek ekstrak biji klabet terhadap gambaran sel-sel vagina, siklus estrus dan lubrikasi. Tabel 1 adalah ringkasan analisis preparat apusan vagina dari semua kelompok uji, sedangkan pada tabel 2 menunjukkan hasil analisis preparat apusan vagina tiap ekor tikus pada lima kelompok uji.

Preparat apusan vagina tikus betina yang telah mempunyai siklus estrus dapat dilihat dari hadirnya tiga jenis sel lapisan vagina, yaitu sel epitel, sel leukosit dan sel yang terkornifikasi dengan berbagai tingkat perbandingan (Turner, 1971). Kelompok kontrol normal tanpa perlakuan menunjukkan hasil negatif, hal ini dapat dilihat dari tidak adanya lubrikasi vagina dan pada preparat tidak terlihat adanya keteraturan kehadiran ketiga sel tersebut (Tabel

Tabel 1. Ringkasan Hasil Analisis Preparat Apusan Vagina Tikus Betina Prepubertal pada Lima Kelompok Uji

Kelompok	Lubrikasi	Siklus Estrus
Normal	-	-
Kontrol estradiol	✓	✓
Dosis 1 (30mg/200gBB)	-	-
Dosis 2 (60mg/200gBB)	✓	✓
Dosis 3 (120mg/200gBB)	✓	✓

Keterangan : ✓ = ada; ✓ = kurang; - = tidak ada

2). Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa hingga usia 35 hari (tikus prepubertal usia 19 hari yang telah mengalami perlakuan 16 hari) tikus belum mengalami pubertas. Pada kelompok kontrol yang diberi estradiol, kelompok perlakuan dosis 3 (120mg/200gBB) serta sebagian kelompok perlakuan dosis 2 (60 mg/200gBB), telah terjadi lubrikasi vagina yang nyata dan ditemukan ketiga jenis sel yang biasa ada pada siklus estrus. Salah satu efek estrogenik adalah mengubah epitel vagina dari kuboid menjadi berlapis (Guyton, 1995). Dengan demikian data ini membuktikan bahwa pada dosis 120 mg/200gBB, ekstrak biji klabet dapat memberikan efek estrogenik terhadap vagina tikus prepubertal.

Pada hari terakhir perlakuan, semua hewan coba diambil darahnya untuk analisa kadar hormon estradiol dan FSH. Analisis kadar dilakukan secara *Radio Immuno Assay*. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data kadar hormon

estradiol dan FSH plasma berdistribusi dan bervariasi normal ($\alpha=0,05$). Selanjutnya dapat dilanjutkan dengan uji ANAVA satu arah dan uji Beda Nyata Terkecil (*LSD Test*).

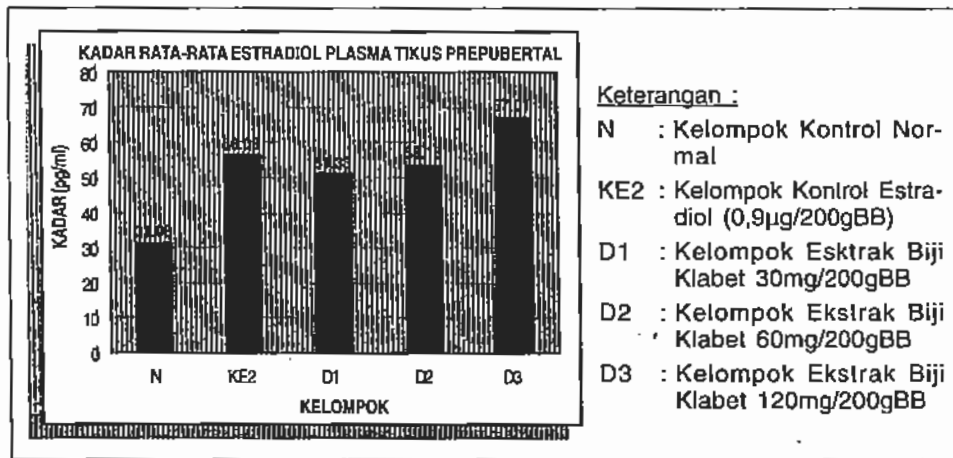
Berdasarkan hasil pengolahan data secara ANAVA satu arah, diketahui bahwa pengaruh pemberian ekstrak biji klabet pada kadar hormon menyebabkan peningkatan kadar rata-rata estradiol plasma tikus prepubertal yang signifikan bila dibandingkan dengan kontrol normal. Kadar rata-rata estradiol kelompok perlakuan yang diberi sediaan estradiol per-oral menyebabkan peningkatan yang bermakna ($\alpha=0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol normal tikus prepubertal tanpa perlakuan. Kadar rata-rata estradiol plasma pada kelompok dosis 2 dan kelompok dosis 3 menunjukkan peningkatan yang bermakna ($\alpha=0,05$) dibandingkan kelompok normal. Tetapi kelompok perlakuan dosis 1 belum menunjukkan peningkatan kadar rata-rata estradiol

Tabel 2. Hasil Analisis Preparat Apusan Vagina Tikus Prepubertal

KODE	H13 K/L/E	H14 K/L/E	H15 K/L/E	H16 K/L/E	H17 K/L/E	Lubrikasi vagina	Siklus Estrus
Kelompok Normal							
1.1	-/-/-	-/-/-	+/+/+	-/-/-	-/-/-	-	-
1.2	-/-/-	-/++/-	-/+/-	-/++/-	-/-/-	-	-
1.3	-/+/-	+/+/+	+/+/-	-/++/-	+/+/-	-	-
1.4	-/-/-	+/+/-	-/-/-	+/-/-	-/-/-	-	-
1.5	-/-/-	-/-/-	-/-/-	+/+/-	-/-/-	-	-
Kelompok Kontrol Estradiol							
2.1	-/+ +/+ +/+	+/+ +/+	+/+ +/+	+/+ +/+	+/+ +/+	✓	✓
2.2	+ / + / +	+ / + / +	+ + / + + +	+ + / +	+ + / + + +	✓	✓
2.3	+ + / +	+ / - / +	+ + / + + + +	+ + / +	+ + / +	✓	✓
2.4	+ / + + / +	+ / + + / + +	+ / + + / +	+ / + + / +	+ / + + / +	✓	✓
2.5	+ / + + / +	+ / + + / +	+ / + + / +	+ / + + / +	+ + / + + + +	✓	✓
Kelompok Dosis 1 (30mg/200gBB)							
3.1	+ / - / -	+ / - / -	+ / + / -	+ + + / - / +	- / - / -	-	-
3.2	+ / + / -	+ / + + / -	- / - / -	+ / - / -	+ / - / -	-	-
3.3	+ / + / -	+ / + / -	+ / + / -	+ / - / +	+ / - / -	-	-
3.4	+ / + / -	- / + + / -	+ / - / -	+ / - / -	+ / - / -	-	-
3.5	+ / - / -	- / - / -	+ / - / -	+ / + / -	+ / + / -	-	-
Kelompok Dosis 2 (60mg/200gBB)							
4.1	+ / + / -	- / + + / -	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	-	-
4.2	+ / + + / -	+ / + + / -	+ + / + + +	- / + / -	+ / - / -	-	-
4.3	- / - / -	+ / + / -	+ / + + / +	+ / + + + / +	+ / + + / +	✓	✓
4.4	+ / + + / +	+ + / + + +	+ / + + / +	+ + / + + + / +	+ + / + + + / +	✓	✓
4.5	+ + / + / -	+ + / + / +	+ / - / -	+ / - / -	+ / - / -	✓	✓
Kelompok Dosis 3 (120mg/200gBB)							
5.1	- / + / -	+ / + + / +	+ / + + / +	+ + / + + + / +	+ + / + / +	✓	✓
5.2	- / - / -	+ / - / -	- / - / -	+ / - / -	+ + / - / + ✓	✓	✓
5.3	+ / + / -	+ / - / -	+ / + / +	+ / - / -	+ / - / -	✓	✓
5.4	+ / - / -	+ + / - / +	- / - / -	+ / + / +	+ / + + / -	✓	✓
5.5	+ / - / -	+ / - / -	+ / - / -	+ / - / -	+ / + + / +	✓	✓

Keterangan :

K : Sel terkornifikasi + : sedikit - : tidak ada
 L : Sel leukosit ++ : sedang ✓ : ada
 E : Sel Epitel +++ : banyak



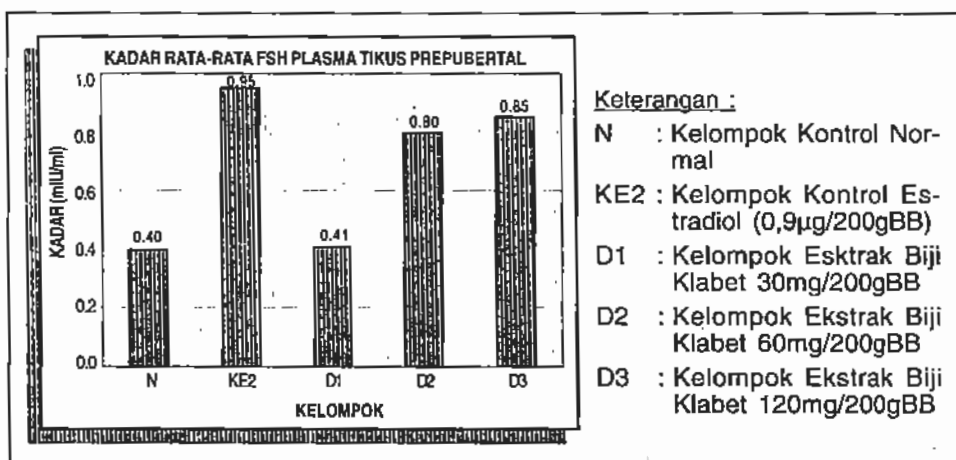
Gambar 1. Grafik Kadar rata-rata hormon estradiol plasma tikus prepubertal.

plasma yang bermakna bila dibandingkan kelompok normal, kelompok kontrol sediaan estradiol dan kelompok dosis 2 maupun dosis 3.

Perbandingan kadar estradiol plasma rata-rata dari kelima kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan grafik tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak biji klabet, memiliki potensi untuk meningkatkan kadar estrogen plasma pada tikus prepubertal. Semakin besar dosis yang diberikan, menyebabkan peningkatan kadar hormon estradiol yang semakin tinggi pula. Hal ini mungkin karena adanya peranan dari kandungan sapogenin steroid biji klabet, diosgenin dan trigoneosida. Diosgenin dikenal sebagai prekursor pembentukan hormon seks antara lain progesteron dan estrogen (Evans, 2002).

Biji Klabet mengandung beberapa sapogenin steroid seperti diosgenin, yamogenin, gitogenin, dan

tigogenin. Menurut Mills & Bone (2000), efek estrogenik dari fitoestrogen sapogenin steroid diperkirakan melalui jalur mekanisme penghambatan atau pengaktifan enzim-enzim yang berperan dalam metabolisme dan biosintesis estrogen sehingga dapat mempengaruhi sekresi hormon. Sapogenin berikatan dengan reseptor estrogen di hipotalamus, yang merupakan bagian dari mekanisme *umpan balik* negatif kontrol estrogen. Stimulus yang lemah menyebabkan tubuh menerima sinyal bahwa kadar estrogen lebih rendah daripada normal, sehingga meningkatkan produksinya. Pada wanita pascamenopause, beberapa fitoestrogen dapat mengurangi simptom penurunan estrogen yang drastis, karena kandungan fitosteroidnya berikatan dengan reseptor yang sesuai di hipotalamus. Hal ini nampaknya menyebabkan peningkatan kadar estrogen.



Gambar 2. Grafik Kadar rata-rata FSH plasma tikus prepubertal.

Dari penelitian terdahulu, fitoestrogen pada umumnya tidak memberikan efek peningkatan estrogen tubuh yang bermakna. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Nikander, *et.al.* (2003) diketahui bahwa fitoestrogen dari derivat isoflavonoid, seperti daidzein, genistein dan equol, tidak memberikan pengaruh terhadap kadar estrogen plasma pada wanita menopause dengan kanker payudara.

Sedangkan hasil analisis ANAVA pemberian ekstrak biji klabet terhadap kadar FSH juga menunjukkan peningkatan yang bermakna ($\alpha=0,05$) terutama pada kelompok perlakuan dosis 2 dan dosis 3. Kelompok kontrol sediaan estradiol juga menunjukkan peningkatan kadar rata-rata FSH yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol normal prepubertal.

Bila dibandingkan kontrol normal, tikus prepubertal yang diberi

perlakuan ekstrak biji klabet mengalami peningkatan kadar FSH plasma yang hampir sama dengan kelompok yang diberi perlakuan kontrol estradiol (0,95 mIU/ml). FSH disekresi oleh hipofisis anterior serta berperan pada proses pematangan folikel di ovarium yang menyebabkan terjadinya sintesis estrogen oleh sel theca ovarium (Turner, 1988).

Pada penelitian menggunakan hewan coba tikus betina dewasa yang telah mengalami hipofisektomi, preparat FSH yang dianggap murni terbukti merangsang folikel hingga menjadi masak (*folikel de Graaf*), tetapi belum menyebabkan ovulasi (Partodihardjo, 1992). Berdasarkan data tersebut di atas, dapat dikatakan bahwa ekstrak biji klabet berpotensi merangsang hipofisis anterior untuk memproduksi FSH yang merangsang pematangan sel theca, yang menghasilkan peningkatan kadar estrogen.

KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji klabet, terutama dosis 60mg/200gBB dan 120mg/200gBB pada tikus betina prepubertal menyebabkan peningkatan kadar estradiol dan FSH plasma yang bermakna secara statistik. Ekstrak biji klabet juga menyebabkan lubri-kasi vagina model hewan uji prepubertal. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa biji klabet mempunyai efek estrogenik d pada tikus betina prepubertal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim.1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Departemen Kesehatan RI, Jakarta: xviii + 196 hlm.
- Anonim. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. BPOM Departemen Kesehatan RI, Jakarta: viii + 68 hlm.
- Badziad, Ali. 2003. *Endokrinologi Ginekologi*. Jakarta: Media Aesculapius. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: xxiv + 167 hlm
- diFiore, Mariano SH. 1986. *Atlas Histologi Manusia*. Edisi kelima. Terj. dari *Atlas of Human Histology*, oleh Moch. Martoprawiro, dkk. EGC, Jakarta : 220-245.
- Ebadi, Manuchair. 1997. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC Press, London: xxviii + 726 hlm.
- Evans, CW. 2002. *Pharmacognosy*. 15th edition. W.B. Saunders, London: xi + 585 hlm.
- Guyton, C.Arthur. 1995. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Terj. dari *Human Physiology and Mechanism of Disease*, oleh Petrus Andrianto. EGC, Jakarta: xii + 821 hlm.
- Harborn. J.B. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB, Bandung: x + 354 hlm.
- Harkness, J.E. & J.E. Wagner. 1989. *The Biology and Medicine of Rabbits and Rodents*. Lea and Febiger, Philadelphia: 47-54.
- [http://www.fenugreek.\(Trigonella.foenum.graecum/html](http://www.fenugreek.(Trigonella.foenum.graecum/html), 6 Januari 2004. 15.35 WIB.
- Jaffe, Bernard M & H.R. Behrman. 1979. *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. 2nd ed. Academic Press, New York: 173-197.
- Johnson, Martin & B. Everitt. 1980. *Essential Reproduction*. Blackwell Scientific Publications, London: xi + 356 hlm.
- Karno, J.L. Onyon, J. Haseman & P. Fenner-Crisp, J. Ashby, & W. Owens. 2001. The OECD Program to Validate Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses : Phase 1. *Environmental Health Perspectives*. Vol.109. No.8: 785-794.
- Lundeen, Scot G, J.M. Carver, M.L. McKean & R.C. Winneker. 1997. Characterization of the Ovariectomized Rat Model for the

- Evaluation of Estrogen Effects on Plasma Cholesterol Levels. *Endocrinology*. Vol.138. No.4: 1552-1558.
- Martin, Annamarie, A.S. Bingel & D.P. Waller. 1990. Bioscreening Technique for Antifertility Activity. Dalam: Thompson, Emmanuel B. *Drug Bioscreening, Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*. VCH Publishers, New York: xvii + 288 hlm.
 - Mills, Simon & K. Bone. 2000. *Principles and Practice of Phytoterapy. Modern Herbal Medicine*. Churcill Livingstone, Edinburgh: xx + 643 hlm.
 - Nikander, Eini, A. Kilkkinen, M. Metsa-Heikkila, H. Adlercreutz, P.Pietinen, A.Tiitinen & O. Ylikorkala. 2003. A Randomized Placebo-Controlled Crossover Trial With Phytoestrogens in Treatment of Menopause in Breast Cancer Patients. *Am.J.Obstet.Gynecol.* Vol.101. No.6: 1213-1220.
 - Owens, William, J. Ashby, J. Odum & L. Onyon. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay. Phase 2: Dietary Phytoestrogen Analyses. *Enviromental Health Perspectives*. Vol.111. No.12: 1559-1567.
 - Partodihardjo, Soebadi. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara Sumber Widya, Jakarta: xvi + 588 hlm.
 - Smith, J.B. & S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Penbiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: 37-55.
 - Sulaiman, W. 2003. *Statistik Non-parametrik: Contoh Kasus dan Pemecahannya dengan SPSS*. Penerbit Andi, Yogyakarta: vi + 168 hlm
 - Turner, C Donnell & J.T. Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum*. Terj. Harsojo. Penerbit Universitas Airlangga, Surabaya: xiii + 746 hlm.
 - Turner, A Robert & P. Hebborn. 1971. *Screening Methods in Pharmacology*. Volume II. Academic Press, New York: xvii + 288 hlm.
 - Widowati, Luci. 2003. Pengaruh Ekstrak Biji Klabet (*Trigonella Foenum-graecum* L.) Terhadap Kadar Gula Darah, Metabolisme Glutation dan Gambaran Kerusakan Sel α Pankreas pada Tikus NIDDM. Tesis Magister Program Pascasarjana Program Studi Ilmu kefarmasian FM IPA-UI, Depok: ix + 108 hlm.
 - Wiryowidagdo, Sumali. 2001. *Kimia dan Farmakologi Bahan Alam*. Universitas Indonesia, Jakarta: viii + 339 hlm.