

**EFEK EKSTRAK ETANOL UMBI UWI UNGU (*Dioscorea alata* L.)
TERHADAP KADAR KALSIUM TULANG TIKUS OVARIIEKTOMI**

***Effect Of Ethanol Extract Of Purple Tubers (Dioscorea Alata L.) On Bone
Calcium Levels In Ovariectomized Rat***

Sri Tasminatun¹, Alfaina Wahyuni², S.N. Nurul Makiyah³, Zulfianisa⁴

¹Bagian Farmakologi FKIK UMY

²Bagian Ilmu Obstetri dan Ginekologi FKIK UMY

³Bagian Histologi FKIK UMY

⁴Mahasiswa Farmasi FKIK UMY

tasmia@yahoo.co.id

ABSTRACT

Postmenopausal osteoporosis is a type of osteoporosis that because decreased bone density due to the lack of estrogen production in menopausal women. Giving *Hormone Replacement Therapy* (HRT) is needed to balance the hormone levels of endogenous estrogen and prevent osteoporosis. However, the many side effects of HRT makes phytoestrogen therapy was chosen as an alternative therapy in *postmenopausal* women. One of the plants that contain phytoestrogens are purple tuber (*Dioscorea alata* L.). The purpose of the research is to determine the effect of an ethanol extract of tubers *D. alata* on bone calcium levels in ovariectomized rat.

Experimental studies *in vivo* with *post test only random control group design* in animals. Thirty old female *Sprague Dawley* rats were randomly assigned to six groups as followed: normal, OVX, OVX-Estradiol (2 µg/day), OVX-EDA with 3 variations of dosage are 116; 232; and 463 mg/kg/day. The administration of extract *D. Alata* was given oral suspension for 30 day. On day 31 the bone of femur and tibia were isolated. The results of the bone samples in isolation was wet destruction and measured levels of calcium bone using *Atomic Absorption Spektrofotometri* (AAS). The data levels bone calcium tested statistics using *One-Way ANOVA*.

The average levels of bone calcium each groups: normal 18.30±3.17%, OVX 16.44±3.93%, OVX-Estradiol 16.59±2.63%, and the group OVX-EDA doses 116; 232; 463 respectively are 15.89±1.66%, 15.96±2.61%, and 14.91±2.31%. It was concluded that the ethanol extract of purple tuber (*Dioscorea alata* L.) with a variation of doses 116; 232; and 463 mg/kg/day for 30 days can not raise the levels of bone calcium in ovariectomized rats. There were no statistically significant differences between treatment groups.

Keywords: *Dioscorea alata*, Phytoestrogen, Calcium.

INTISARI

Postmenopausal osteoporosis merupakan tipe osteoporosis yang dikarenakan berkurangnya densitas tulang akibat tidak adanya produksi estrogen pada wanita menopause. Pemberian *Hormon Replacement Therapy* (HRT) diperlukan untuk menyeimbangkan kadar hormon estrogen endogen dan mencegah terjadinya osteoporosis. Namun, banyaknya efek samping penggunaan HRT menjadikan terapi fitoestrogen banyak dipilih sebagai alternatif terapi pada wanita menopause. Salah satu tanaman yang mengandung fitoestrogen adalah umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.). Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek ekstrak etanol umbi *D. alata* terhadap kadar kalsium tulang tikus ovariectomi.

Studi eksperimental *in vivo* dengan desain *post test only random control group* pada hewan uji. Sebanyak 30 ekor tikus putih betina *Sprague Dawley* dibagi dalam 6 kelompok, yaitu: normal, OVX, OVX-Estradiol (2 µg/hari), OVX-EDA dengan 3 variasi dosis yaitu 116; 232; 463 mg/kgBB/hari. Ekstrak *D. alata* diberikan dalam bentuk suspensi oral selama 30 hari. Pada hari ke-31 tulang femur dan tibia tikus diisolasi. Hasil isolasi sampel tulang didestruksi basah dan diukur kadar kalsium tulang menggunakan *Spektrofotometri Serapan Atom* (SSA). Data kadar kalsium tulang diuji statistik menggunakan *one way ANOVA*.

Rata-rata kadar kalsium tulang setiap kelompok yaitu: normal $18,30 \pm 3,17\%$, OVX $16,44 \pm 3,93\%$, OVX-Estradiol $16,59 \pm 2,63\%$, dan kelompok OVX-EDA dosis 116; 232; 463 berturut-turut adalah $15,89 \pm 1,66\%$, $15,96 \pm 2,61\%$, dan $14,91 \pm 2,31\%$. Disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan variasi dosis 116; 232; dan 463 mg/kgBB/hari selama 30 hari tidak dapat menaikkan kadar kalsium tulang pada tikus ovariectomi. Secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

Kata kunci: *Dioscorea alata*, Fitoestrogen, Kalsium.

PENDAHULUAN

Osteoporosis adalah kondisi umum dimana tulang menjadi lemah dan mudah patah. Osteoporosis merupakan suatu penyakit metabolik tulang yang ditandai dengan menurunnya massa tulang, dikarenakan berkurangnya matriks dan mineral tulang yang disertai dengan kerusakan mikroarsitektur

dari jaringan tulang sehingga mengakibatkan menurunnya kekuatan tulang, dan meningkatkan risiko terjadinya patah tulang.¹ *National Osteoporosis Foundation* menyatakan sekitar 44 juta orang Amerika berisiko mengalami osteoporosis dan 22% diantaranya merupakan orang dewasa hingga lansia yang sebagian besar adalah wanita menopause.²

Menopause menggambarkan keadaan gagalnya ovarium dalam memproduksi estrogen. Hormon estrogen pada wanita ikut berperan dalam penyerapan kalsium di usus untuk menjaga kepadatan tulang. Penurunan penyerapan kalsium akan mengganggu keseimbangan kalsium dalam darah, karena kalsium darah yang rendah dapat mengakibatkan reabsorpsi kalsium pada tulang meningkat dan menyebabkan massa tulang rendah. Menurunnya kadar kalsium tulang akibat defisiensi estrogen disebut *postmenopausal osteoporosis* atau *osteoporosis tipe I*.³

Pemberian hormon pengganti estrogen (*Estrogen Replacement Therapy-ERT*) banyak diberikan kepada wanita menopause untuk mengatasi gejala yang timbul pasca-menopause dan untuk mencegah terjadinya penyakit kronik seperti osteoporosis.⁴ Preparat hormon estrogen sintetis yang diberikan sebagai terapi sulih hormon selain harganya mahal juga memiliki efek samping yang merugikan. Estrogen sintetis dapat mengganggu proses pembekuan darah, mengganggu kerja enzim dalam hati, menyebabkan timbulnya pendarahan endometrium uterus, mual dan muntah.⁵

Penggunaan preparat estrogen sintetis secara terus-menerus dapat menyebabkan terjadinya karsinoma ovarium.⁶ Selain itu, penggunaan preparat estrogen dan progesteron sebagai terapi sulih hormon juga dapat berisiko kanker payudara.⁷

Adanya efek samping yang ditimbulkan dari terapi hormonal, menjadikan terapi fitoestrogen dipilih sebagai terapi alternatif pada wanita menopause karena lebih aman.⁸ Fitoestrogen merupakan senyawa alami dari tanaman yang mampu mempengaruhi aktivitas estrogenik tubuh.⁹

Salah satu tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen adalah umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.). Umbi *D. alata* memiliki 5 senyawa bersifat estrogenik berdasarkan aktivitas transkripsi *ligand-dependent*¹⁰ dan pemberian tepung umbi *D. alata* dapat meningkatkan kekuatan tulang pada tikus ovariektomi.¹¹

Pada penelitian ini akan dilakukan uji efek ekstrak etanol umbi *D. alata* terhadap kadar kalsium tulang tikus ovariektomi yang diukur menggunakan *Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)*. Penelitian ini diharapkan mampu membuktikan efek ekstrak etanol umbi *D. alata* terhadap kenaikan kadar kalsium tulang pada tikus ovariektomi, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen fitoestrogen untuk mencegah osteoporosis pada wanita menopause. Hasil penelitian ini juga dapat digunakan sebagai sumber referensi dalam pemanfaatannya dan bagi peneliti lain dalam bidang farmakologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol umbi *D. alata* terhadap kadar kalsium tulang tikus ovariektomi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM) dan Laboratorium Biomedis FKIK UMY selama 4 bulan. Alat-alat yang digunakan antara lain adalah kandang tikus, timbangan hewan, dan timbangan analitik, maserator, *rotary evaporator*, sonde oral, *sput* injeksi, seperangkat alat bedah tikus, kertas saring, *Spektrofotometri Serapan Atom*, lemari pendingin, tempat minum dan tempat pakan tikus, sarung tangan dan alat-alat gelas: Erlenmeyer, gelas ukur. Bahan yang digunakan berupa serbuk umbi *D. alata*, CMC Na 0,5%, etanol 70%, hormon estradiol, pakan standar AD2, *aquadest*, ketamin, *ampicillin powder for injection*, *water for injections*, povidon iodine 10%, larutan Asam Nitrat pekat, Larutan Asam Perklorat, air suling dan Kalsium Karbonat.

Pembuatan Ekstrak Etanol Umbi D. alata

Sebanyak 3 kg serbuk umbi *D. alata* diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 10 bagian. Pada ekstraksi pertama digunakan etanol sebanyak 7,5 bagian selama lima hari. Setelah itu ekstrak cair dipisahkan dari residu. Residu selanjutnya diremaserasi dengan etanol 70% sebanyak 2,5 bagian selama dua hari.

Filtrat yang diperoleh dari dua tahap maserasi, selanjutnya dicampur

untuk diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 80°C. Proses ini dilakukan sampai mendapatkan ekstrak kental dan tidak berbau etanol. Ekstrak kental inilah yang digunakan dalam penelitian.

Persiapan Dan Pengelompokan Hewan Uji

Seluruh hewan uji diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian pakan standar AD2 dan air minum. Sebanyak 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague-Dowley* dibagi secara acak menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu, kelompok normal, kelompok kontrol negatif ovariektomi (OVX), kelompok kontrol positif OVX-Estradiol, dan kelompok perlakuan ekstrak umbi *D. alata* (EDA) yaitu OVX-EDA 116, OVX-ED 232, dan OVX-EDA 463.

Pembuatan Hewan Model Ovariektomi

Ovariektomi dilakukan kepada seluruh kelompok hewan uji kecuali kelompok normal pada hari ke-8 pasca-adaptasi. Tikus yang telah ditimbang, diinjeksi ampicillin sebagai profilaksis dosis 4 mg/kgBB secara intramuscular (IM). Kemudian, tikus dianastesi dengan ketamin dosis 100 mg/kgBB secara intramuscular (IM). Setelah tikus teranastesi, bulu daerah flank dicukur dan didesinfeksi menggunakan alkohol 70%. Insisi dilakukan pada daerah bedah dengan panjang 1,5 cm, kemudian ovarium

diikat menggunakan benang cat gut. Setelah ovarium diikat, lalu dilakukan penjahitan otot dan kulit luar. Mengoleskan povidon iodine pada luka bedah untuk mencegah timbulnya infeksi pasca-pembedahan. Tikus yang sudah diovariectomi ditempatkan pada kandang yang bersih. Semua tikus kembali diinjeksi ampicillin dosis 4 mg/kgBB IM sebagai profilaksis. Selama 20 hari proses menopause tikus diberi makan dan minum standar.

Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Umbi D. alata

Ekstrak umbi *D. alata* yang diberikan disuspensikan dalam CMC Na 0,5% (*Carboxymethylcellulose natrium*). Pemberian ekstrak etanol umbi *D. alata* dilakukan sehari sekali selama 30 hari secara oral dengan teknik sonde dengan dosis 116 mg/kgBB/hari, 232 mg/kgBB/hari, 463 mg/kgBB/hari pada kelompok perlakuan OVX-EDA. Kelompok OVX-Estradiol diberi estradiol dosis 2 µg/hari dan kelompok kontrol dan OVX tidak diberi perlakuan. Pada hari ke-31 tikus dikorbankan lalu diambil tulang paha kaki

Pengukuran Kadar Kalsium Tulang Menggunakan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)

Tulang yang sudah diisolasi kemudian ditimbang untuk mengetahui bobot tulang. Sampel tulang yang sudah ditimbang kemudian didestruksi menggunakan

15 ml HNO₃ dan 3 ml HClO₄ sambil dipanaskan hingga tulang larut dan larutan menjadi jernih. Destruksi dilanjutkan hingga sampel tersisa sebanyak ± 3 ml, kemudian menambahkan 25 ml air suling ke dalamnya. Larutan sampel kemudian disaring dan diencerkan dengan air suling hingga tanda pada labu 100 ml. Sampel hasil destruksi siap dibaca absorbansinya menggunakan SSA pada panjang gelombang (λ) 422,7 nm. Hasil pembacaan kemudian dibandingkan dengan kurva standar, sehingga diperoleh kadar kalsium dalam satuan mg/dl atau ppm.

Kurva standar merupakan hasil pengukuran absorbansi dari beberapa seri pengenceran larutan standar kalsium. Konsentrasi Kalsium Karbonat (CaCO₃) yang digunakan sebagai larutan standar adalah 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 3; 4; dan 5 mg/L. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar akan menghasilkan persamaan garis linier yang digunakan untuk mengetahui kadar kalsium sampel tulang tikus ovariektomi.

Analisis Data

Data kadar kalsium tulang diuji normalitasnya menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Data hasil uji normalitas dan uji varians selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata kadar kalsium tulang hasil pengukuran kadar kalsium tulang pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague-Dowley* model ovariektomi dengan terapi

pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) yang diukur dengan *Spektrofotometri Serapan Atom* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-Rata Kadar Kalsium Tulang

No.	Kelompok Perlakuan	Rata-rata kadar Ca (%) Tulang
1.	Normal	18,30 ± 3,17
2.	OVX	16,45 ± 3,94
3.	OVX-Estradiol	16,59 ± 2,63
4.	OVX-EDA dosis 116 mg/kgBB/hari	15,89 ± 1,66
5.	OVX-EDA dosis 232 mg/kgBB/hari	15,96 ± 2,61
6.	OVX-EDA dosis 463 mg/kgBB/hari	14,91 ± 2,31

Ovariektomi adalah proses operasi pengambilan ovarium yang dilakukan untuk membuat tikus model menopause. Asumsinya, setelah dilakukan ovariektomi, tikus akan mengalami penurunan hormon estrogen sehingga menyerupai keadaan defisiensi hormon estrogen pada wanita menopause. Menurunnya kadar hormon estrogen tikus setelah ovariektomi dikarenakan ovarium sebagai penghasil hormon estrogen sudah diangkat. Penurunan kadar estrogen pada hewan model ovariektomi sudah dibuktikan oleh Hartiningsih *et al.*, (2010)¹² yang menjelaskan bahwa ovariektomi pada tikus dapat menurunkan kadar hormon estrogen secara drastis, sehingga menggambarkan keadaan menopause.

Terdapat perbedaan kadar kalsium tulang pada kelompok normal dan kelompok OVX. Kelompok perlakuan tikus normal adalah kelompok yang menggambarkan keadaan ovarium

normal dan masih menghasilkan hormon estrogen endogen. Rata-rata kadar kalsium tulang kelompok normal adalah 18,30%, lebih tinggi dibandingkan kelompok OVX yaitu 16,45% walaupun secara statistik tidak berbeda signifikan. Penurunan kadar kalsium tulang pada kelompok OVX membuktikan bahwa defisiensi estrogen pada tikus ovariektomi ikut menurunkan kadar kalsium tulang. Hasil serupa pernah dibuktikan oleh penelitian Nurrochmad *et al.*, (2010).²

Defisiensi estrogen endogen pada wanita menopause dapat menyebabkan peningkatan proses osteoklastogenesis dan kehilangan massa tulang. Oleh karena itu, untuk menjaga keseimbangan hormon estrogen, wanita menopause perlu diberi hormon pengganti estrogen. Pemberian estrogen dapat meningkatkan apoptosis sel osteoklas dengan cara menghambat terbentuknya sitokin-sitokin yang

dapat merangsang diferensiasi sel osteoklas (IL-1, IL-6, dan TNF- α). Selain itu, pemberian estrogen juga dapat merangsang ekspresi *osteoprotegerin* (OPG) dan TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) dari sel osteoblas dan sel stroma, sehingga dapat menghambat resorpsi tulang.^{13,14} Hal ini sesuai dengan hasil kadar kalsium kelompok OVX-Estradiol yang mendapatkan terapi Estradiol 2 μ g/hari, yaitu rata-rata kadar kalsiumnya adalah 16,59% lebih tinggi dibandingkan dari kelompok OVX.

Mekanisme *bone resorption* yang diperantarai oleh sel osteoklas akan merusak ikatan kristal-kristal mineral tulang yang berbentuk *calcium phosphatase* dengan matriks kolagen. Interaksi osteoklas dengan permukaan tulang saat proses resorpsi selain melepaskan beberapa asam (misalnya asam sitrat, asam laktat) dari mitokondria dan vesikel sekretorik juga melepaskan ion-ion hidrogen melalui saluran *carbonat anhidrase* dan *vacuolar ATPase pompa proton*. Hal ini menciptakan lingkungan asam di *resorptive pit*, yang mengakibatkan rusaknya matriks tulang.¹⁵ Sel osteoblas mempunyai peran dalam mensekresikan komponen matriks tulang seperti kolagen dan proteoglikan. Kolagen berperan dalam memberikan kekuatan matriks dan mengikat garam mineral tulang. Proteoglikan berfungsi dalam mendeposisikan mineral tulang.¹⁵

Kalsium dan garam fosfat akan terdeposito pada permukaan sel-sel pembentuk tulang sebagai senyawa non-kristal yang kemudian dikonversikan menjadi *hydroxyapatite* [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] garam kristal utama tulang. Fungsi *hydroxyapatite* adalah untuk menyimpan ion dan memberikan kekuatan tulang. Beberapa *hydroxyapatite* tetap dalam bentuk non-kristal untuk memfasilitasi penyerapan yang cepat bila diperlukan.¹⁵

Rata-rata kadar kalsium tulang yang diperoleh dari tikus kelompok perlakuan OVX-EDA 116; 232; 463 berturut-turut adalah 15,89%; 15,96%; 14,91% dimana lebih kecil dibandingkan dengan kelompok OVX dan kelompok OVX-Estradiol. Pemberian ekstrak umbi *D. alata* selama 30 hari tidak memberikan efek kenaikan kadar kalsium yang signifikan secara statistik.

Umbi *D. alata* diyakini mengandung fitoestrogen yang bermanfaat bagi wanita menopause. Senyawa fitoestrogen dalam umbi *D. alata* berbeda dari jenis fitoestrogen yang ada, yaitu senyawa diosgenin. Diosgenin yang terkandung dalam umbi *D. alata* merupakan spirostanol saponin yang tersusun atas gula hidrofilik dan terikat pada aglikon steroid hidrofobik. Efek estrogenik dari diosgenin banyak dimanfaatkan sebagai prekursor utama produksi steroid sintetik.¹⁶ Telah dibuktikan sebelumnya mekanisme kerja efek estrogenik diosgenin hampir sama

dengan hormon estrogen yaitu mempengaruhi proses formasi dan resorpsi tulang yang dilihat dari hasil rasio RANKL/OPG oleh Zhang *et al.*, (2014).¹⁷

Kecilnya efek estrogenik yang ditimbulkan pada kenaikan kadar kalsium tulang dapat disebabkan oleh banyak faktor yang dapat mempengaruhi proses formasi tulang. Salah satu faktor penyebabnya adalah kurangnya dosis pemberian ekstrak etanol umbi *D. alata*. Zhang *et al.*, (2014)¹⁷ menyatakan bahwa pemberian diosgenin dosis 96 mg/kgBB/hari selama 12 minggu dapat memberikan efek antiosteoporosis pada wanita menopause. Dalam penelitian lain, menyebutkan bahwa kadar diosgenin yang terdapat dalam 100 g umbi *D. alata* hanya 82,39 mg diosgenin.¹⁸ Oleh karena itu pemberian ekstrak etanol umbi *D. alata* dosis 116; 232; 463 mg/kgBB/hari tidak memberikan efek antiosteoporosis dalam meningkatkan kadar kalsium tulang karena dosis yang digunakan kurang dan waktu pemberian yang singkat. Kadar kalsium tulang selain dipengaruhi oleh hormon estrogen, juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti kalsitonin, hormon paratiroid dan asupan vitamin D yang ikut berperan dalam mengatur fungsi osteoklas dan osteoblas.¹⁹

Hasil analisis statistik uji ANOVA menunjukkan bahwa kadar kalsium tulang antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara

signifikan, yang ditunjukkan dari nilai signifikansi $p > 0,05$ (0,554). Selain itu, dilihat dari hasil uji *Tukey* yang dilakukan juga menunjukkan nilai signifikansi semua sampel diatas 0,05 yang berarti semua data kadar kalsium tulang memang tidak berbeda secara nyata antar perlakuan.

KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) dengan variasi dosis 116; 232; dan 463 mg/kgBB/hari selama 30 hari tidak dapat menaikkan kadar kalsium tulang pada tikus ovariektomi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak etanol umbi uwi ungu (*Dioscorea alata* L.) pada tikus ovariektomi dengan dosis yang lebih tinggi dan perlakuan lebih lama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dekan FKIK UMY yang telah memberikan dana penelitian melalui program Penelitian Reguler FKIK UMY tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- National Osteoporosis Foundation. *Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis*. Washington DC: National Osteoporosis Foundation (2010).
- ¹Kawiyana, (2009). Osteoporosis Patogenesis Diagnosis Dan Penanganan Terkini. Sub Bagian/SMF Orthopaedi & Traumatologi. Bagian Bedah FK UNUD / RSUP Sanglah Denpasar. *Jurnal Penyakit Dalam, Volume 10 Nomor 2*.
- ⁴Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Pedoman Pengendalian Osteoporosis. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 1142/MENKES/SK/XII/2008:3-4*.
- ⁹Biben H.A., (2012). *Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan Keamanan Penggunaannya*. Disampaikan dalam Seminar Ilmiah Nasional Estrogen Sebagai Sumber Hormon Alami pada 31 maret 2012.
- ⁸Rimoldi, G., *et al.* (2007). Effect of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Jurnal, Jerman, Universitas Georg-August*.
- ¹²Hartiningsih, Devita, A., Irkham, W., (2010). *Pengaruh Panhisterektomi dan Konsumsi Suplemen 1,25-Dihidroksivitamin D3 Selama 1,5 Bulan terhadap Retensi Kalsium pada Tikus Wistar*. Lembaga Penelitian Universitas Gadjah Mada.
- ¹⁶Prabowo, A.Y., Estiasih, T., Purwatiningrum, I., (2014). Gambili (*Dioscorea esculata* L.) as Food Contain Bioactive Compound: A Review. *Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol.2 No.3 p.129-135, Juli 2014*.
- ¹⁰Cheng Wei-Yi, Kuo Yueh-Hsiung, & Huang Ching-Jang. (2007). Isolation and Identification of Novel Estrogenic Coumponds in Yam Tuber (*Dioscorea alata* CV. Tainung No. 2). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55 No. 18, 7350-7358.
- ¹⁷Zhang, Z., Song, C., Fu, X., Liu, M., *et al.*, (2014). High-Dose Diosgenin Reduces Bone Loss in Ovariectomized Rats via Attenuation of the RANKL/OPG Ratio. *Article. Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 17130-17147 ISSN 1422-0067.
- ¹⁸Mar'atirrosyidah R., Estiasih, T., (2015). Aktivitas Antioksidan Senyawa Bioaktif Umbi-Umbi Lokal Inferior: Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol. 3 No. 2 p.594-601, April 2015*.
- ³Lane, Nancy E. (1999). *Lebih Lengkap Tentang : OSTEOPOROSIS Rapuh Tulang*, (Eri D. Nasution, Penerjemah). Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- ⁵Wratsangka, R., (1999). Pemberian Terapi Sulih Hormon Sebagai Upaya Meningkatkan Kesehatan Wanita Menopause. 155-162. *J Kedokter Trisakti, September-Desember 1999-Vol.18, No.3*.
- ¹⁵Kennedy, P., Jain, A., Srinivasan, R., and Chaudhry, S. (2008). Bone Homeostasis. *Artikel McMaster Pathophysiology Review*. Diakses pada 10 Juni 2015, dari <http://www.pathophys.org/osteoporosis/>

- ⁶Gang P, Kerlikowske K, Subak L, dan Grady D, (1999). *Hormone Replacement Therapy and the Risk of Epithelial Ovarian Carcinoma: a Meta-Analysis*. *Obs Gyn*.92: 472–479.
- ⁷Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, dan Pike MC., (2000). *Effect of Hormone Replacement Therapy on Breast Cancer Risk: Estrogen Versus Estrogen Plus Progestin*. *Natl Cancer Inst*.92: 328–32.
- ¹⁹Trihapsari, E., (2009). Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Densitas Mineral Tulang Wanita > 45 Tahun di Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta Pusat Tahun 2009. *Skripsi*. Fakultas Kesehatan Masyarakat, Program Studi Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia, Depok.
- ²Nurrochmad A., Leviana F., Wulancarsari C. G., Lukitaningsih E., (2010). Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* Prevent Bone Loss in an Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis. *International Journal of Phytomedicine* 2 363-372. ISSN: 0975-0185.
- ¹¹Chen Jian-Horng, Wu James, Lin Hsiao-Che, Wu Shey-Lin, Wang Wen-Fu, Huang Shu-Kuei., *et al.* (2008). Dioscorea improves the morphometric and mechanical properties of bone in ovariectomised rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88:2700-2706.