

**Struktur Histologi Trabekula Femur Mencit (*Mus musculus* L.)
Orkidektomi Pasca Pemberian Ekstrak tempe Kedelai**

*(Histological Structure of Mouse (*Mus musculus* L) Femur Trabeculae Orchidectomy
After Administration of Soybean Tempeh Extract)*

**Susantin Fajariyah*, Siti Nafi'atul Muta'alimah, Eva Tyas Utami,
Asmoro Lelono, Husnatun Nihayah**

Program Studi Biologi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember

**Email korespondensi: susantin.fmipa@unej.ac.id*

ABSTRAK

Defisiensi testosteron disebabkan antara lain karena usia lanjut, penyakit kronis, kanker testis yang mengakibatkan menurunnya densitas tulang. Pada pria estrogen lebih berperan dalam proses resorpsi tulang dibandingkan hormon testosteron. Oleh sebab itu untuk mencegah penurunan densitas pada kondisi defisiensi testosteron perlu dilakukan pemberian fitoestrogen eksternal antara lain tempe, yang mengandung isoflavon deidzein dan genistein. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji efek pemberian ekstrak tempe terhadap struktur histologi trabekula femur mencit orkidektomi. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (tanpa orkidektomi), kontrol positif (orkidektomi) dan 2 kelompok perlakuan orkidektomi dilanjutkan dengan pemberian ekstrak tempe masing-masing dengan dosis 0,6 g/ml/hari (D1), dan 1,2 g/ml/hari (D2). Pemberian ekstrak tempe dilakukan secara gavage selama 15 hari setelah masa penyembuhan orkidektomi bilateral selama 30 hari. Satu hari setelah pemberian ekstrak tempe terakhir mencit dibius dan dibedah untuk diambil tulang femur untuk dibuat preparat dengan metode parafin dan pewarnaan HE. Parameter yang diamati adalah jumlah osteoblast dan osteoklas serta tebal trabekula femur. Pemberian ekstrak tempe kedelai dosis 0,6 mg/ml/hari secara gavage selama 15 hari dapat menyebabkan peningkatan jumlah osteoblast dan tebal trabekula, serta menurunkan jumlah osteoklast femur mencit orkidektomi.

Kata kunci: Orkidektomi; tempe; trabekula; femur; mencit

ABSTRACT

Testosterone deficiency is caused by, among other things, old age, chronic disease, and testicular cancer, which results in decreased bone density. Estrogen plays a more important role in the process of bone growth and resorption than the hormone testosterone. Therefore, to prevent a decrease in density in conditions of testosterone deficiency, it is necessary to administer external phytoestrogens, including tempeh, containing isoflavones deidzein dan genistein. The aim of this study was to determine the effect of administering tempeh extract on the histological structure of the femoral trabeculae of orchidectomized mice. Mice were divided into 4 groups, namely negative control (without orchidectomy), positive control (orchidectomy), and 2 orchidectomy treatment groups, followed by administration of tempeh extract at a dose of 0.6 g/ml/day (D1) and 1.2 g/ml/day (D2). Tempeh extract was administered by gavage for 15 days after a 30-day healing period for bilateral orchidectomy. One day after the last administration of tempeh extract, the mice were anesthetized and dissected to remove the femur bones to make preparations using the paraffin method and HE staining. The parameters observed were the number of osteoblasts and osteoclasts and the thickness of the femoral trabeculae. Giving soybean tempeh extract at a dose of 0.6 mg/ml/day by gavage for 15 days can cause an increase in the number of osteoblasts and trabecular thickness, as well as reducing the number of osteoclasts in the femur of orchidectomized mice.

Keywords: Orchidectomy; tempe; trabecular; femur; mice

PENDAHULUAN

Hormon testosteron berperan penting untuk menjaga kesehatan pria antara lain menjaga metabolisme tulang, fungsi hati, endotel dan lain-lain. Pada kondisi tertentu misalnya karena usia lanjut, penyakit kronis, kanker testis produksi testosteron akan menurun yang disebut dengan defisiensi testosteron. Salah satu akibat dari defisiensi testosteron menurunnya densitas tulang bahkan bisa

menyebabkan osteoporosis. Osteoporosis merupakan ketidakseimbangan antara resorpsi tulang melebihi pembentukan tulang (Meisher, 2016).

Hewan model osteoporosis pada kondisi defisiensi testotestosterone digunakan prosedur orkidektomi (Sophocleous & Idris, 2019). Orkidektomi adalah prosedur pengambilan testis untuk menurunkan produksi testotestosterone. Menurut Ryu *et al.* (2015) kepadatan mineral tulang femur tikus Sprague Dawley umur 10 minggu signifikan menurun setelah 8 dan 10 minggu setelah orkidektomi bilateral. Jumlah osteosit tikus jantan menurun enam minggu setelah disterilisasi (orkidektomi) (Fatmawati *et al.*, 2021).

Testosterone mempengaruhi fungsi dari sel dengan cara berikatan dengan reseptor yang terdapat di sitoplasma. Testosterone berikatan dengan reseptor androgenik (AR) yang terdapat pada osteoblast dan menginduksi ekspresi *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), serta *transforming growth factor- β* (TGF- β) yang berperan dalam diferensiasi dan proliferasi osteoblast (Shigehara *et al.*, 2021). Pada kondisi defisiensi testosterone akan menginduksi osteoblast untuk memproduksi *receptor the activation of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) yang berfungsi untuk meningkatkan diferensiasi dan fungsi osteoklast. Meningkatnya kadar RANKL akan meningkatkan resorpsi tulang dan menurunkan densitas tulang. Testosterone dan estrogen sama-sama berperan penting dalam pembentukan tulang. Pada pria proses resorpsi tulang 70 % dipengaruhi oleh hormon estrogen dan 30% dipengaruhi oleh hormon testosterone (Herrera, 2012). Estrogen lebih berperan dalam proses resorpsi tulang pria, sehingga perlu dicari alternatif untuk pencegahan osteoporosis pria dengan memberikan fitoestrogen eksternal. Fitoestrogen mempunyai struktur mirip dengan estrogen endogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Filipovic *et al.*, 2018). Salah satu sumber fitoestrogen adalah tempe kedelai.

Tempe kedelai merupakan makanan tradisional Indonesia yang berasal dari kedelai yang difermentasi, mudah didapat dengan harga terjangkau. Tempe kedelai antara lain mengandung protein, serat, isoflavon, sterol (Astawan *et al.*, 2017). Lebih lanjut Astawan *et al.* (2017) menyatakan bahwa jenis isoflavon pada tempe kedelai adalah daidzein dan genistein yang memiliki struktur serta komposisi kimiawi mirip dengan β -estradiol atau estrogen. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa isoflavon mempunyai potensi mencegah osteoporosis. Tikus Wistar setelah 2 minggu orkidektomi bilateral diberi genistein 30 mg/kg bb setiap hari selama 3 minggu terjadi peningkatan tebal trabekula dan jumlah trabekula (Filipovic *et al.*, 2018). Lebih lanjut Sun *et al.* (2016) menyatakan bahwa daidzein mempunyai efek antara lain sebagai antioksidan, anti-inflamasi dan juga anti-osteoporosis. Selama ini pemberian isoflavon genistein dan daidzein untuk mencegah osteoporosis diaplikasikan dalam bentuk senyawa kimia murni. Pemberian tepung tempe var Grobogan lebih meningkatkan jumlah osteoblast dan osteosit pada tibia tikus jantan normal atau tanpa orkidektomi dibandingkan tepung kedelai (Wresdiati *et al.*, 2021). Pemberian ekstrak tempe terhadap mencit orkidektomi bilateral belum ada informasi. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap struktur histologi trabekular femur mencit (*Mus musculus* L) orkidektomi.

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan uji yang digunakan adalah 24 ekor mencit (*Mus musculus* L) strain DDY jantan umur 8-10 minggu dengan berat badan 25-30 gram. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (tanpa orkidektomi), kontrol positif (orkidektomi) dan 2 kelompok perlakuan orkidektomi dilanjutkan dengan pemberian ekstrak tempe masing-masing dosis 0,6 g/ml/hari (D1), dan 1,2 g/ml/hari (D2). Tiap perlakuan terdiri dari 6 ulangan.

Pembuatan mencit orkidektomi bilateral

Orkidektomi bilateral adalah prosedur pengambilan kedua testis. Pertama-tama alat bedah di sterilkan dan kulit mencit dicukur. Mencit dibius secara intramuskular dengan ketamin dan xylazine dengan perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml. Kulit dan otot mencit dibedah pada bagian abdomen selanjutnya testis, epididimis dan vas deferens dikeluarkan dari abdomen. Vas deferens dan pembuluh darah diikat diikat, selanjutnya testis dan epididimis dipotong sekitar 2 mm dari ikatan. Tahap terakhir otot dan kulit dijahit dengan benang silk, dan bekas luka diberi betadine (Sophocleous & Idris, 2019)

Pembuatan ekstrak tempe kedelai

Tempe kedelai yang diperoleh di Pasar Kepatihan Jember difermentasi selama 3 hari kemudian diiris tipis, dikering anginkan selama 3 hari. Selanjutnya tempe diayak dengan ayakan 60 mesh dan ditimbang berat kering. Selanjutnya tepung tempe yang sudah halus dimaserasi dalam alkohol 96% dengan perbandingan 1:4, selama 24 jam distirer elektrik 500 rpm selama 15 menit dan didiamkan selama 2 x 24 jam sambil sekali kali diaduk. Langkah berikutnya yaitu disaring untuk mendapatkan filtrat, kemudian dimasukkan ke dalam rotary evaporator selama ± 4-5 jam dengan suhu 80°C hingga didapatkan filtrat.

Perlakuan Hewan Uji

Pemberian ekstrak tempe kedelai dilakukan setelah mencit mengalami masa pemulihan selama 30 hari setelah orkidektomi. Ekstrak tempe kedelai diberikan secara gavage dengan volume 1 ml selama 15 hari. Satu hari setelah pemberian ekstrak tempe kedelai terakhir dibius dengan khloroform kemudian diambil femur untuk pembuatan histologi dengan Metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (Mahriani et al., 2020.)

Parameter yang diamati

Pengamatan yang dilakukan meliputi pengukuran ketebalan trabekula, jumlah osteoblast dan osteoklast pada bagian metafisis femur.

Analisis Data

Data hasil pengamatan jumlah osteoblast, osteoklast dan ketebalan trabekular femur dianalisis menggunakan uji One Way ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$ dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan (Fitri *et al.*, 2023).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata jumlah osteoblast, jumlah osteoklas dan tebal trabekula femur setelah pemberian ekstrak tempe kedelai selama 15 hari terhadap mencit orkidektomi dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1 Rata-rata jumlah osteoblast, jumlah osteoklas dan tebal trabekula femur mencit (*Mus musculus* L) orkidektomi setelah pemberian ekstrak tempe kedelai

Perlakuan	Σ osteoblast	Σ osteoklas	Ketebalan trabekula (μm)
K- (tanpa orkidektomi, tanpa ekstrak tempe kedelai)	45,17 $\pm$ 4,95 ^a	3,83 $\pm$ 1,47 ^a	50,41 $\pm$ 9,59 ^a
K+(orkidektomi, tanpa ekstrak tempe kedelai)	33,67 $\pm$ 5,64 ^b	5,67 $\pm$ 1,21 ^b	38,46 $\pm$ 11,22 ^b
D1(orkidektomi+ekstrak tempe kedelai 0,6 mg/ml/hari)	39,83 $\pm$ 6,64 ^{ab}	3,50 $\pm$ 1,05 ^b	46,31 $\pm$ 3,54 ^a
D2(orkidektomi+ekstrak tempe kedelai 1,2 mg/ml/hari)	43,83 $\pm$ 5,34 ^a	3,00 $\pm$ 0,89 ^b	54,41 $\pm$ 9,41 ^a

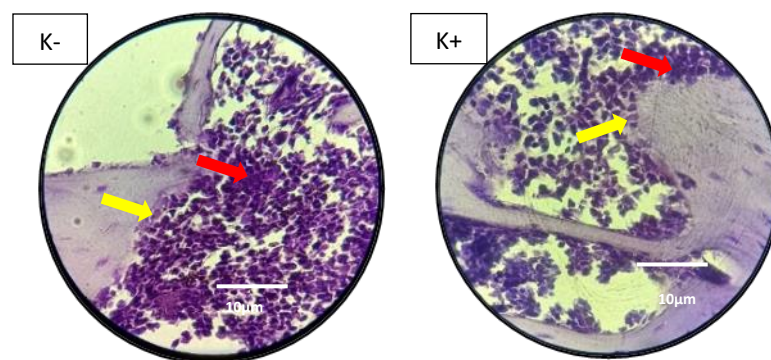
Dari **Tabel 1** diketahui bahwa jumlah osteoblast, jumlah osteoklast dan tebal trabekula pada kelompok kontrol negatif dan positif (orkidektomi) berbeda signifikan pada derajat kepercayaan 5%. Orkidektomi biasa dipakai sebagai model defisiensi testosteron pada hewan jantan. Dalam penelitian ini memakai hewan uji mencit yang diorkidektomi bilateral. Elagizi *et al.* (2017) menyatakan bahwa defisiensi testosteron akan mempengaruhi profil fenotip (menurunnya massa otot, densitas tulang), mempengaruhi profil metabolik (diabetes, meningkatnya LDL). Salah satu akibat defisiensi testosteron adalah menurunnya densitas tulang bahkan bisa menyebabkan osteoporosis. Osteoporosis pada pria pada umumnya terjadi karena kelainan metabolik antara lain karena hipogonadisme (kekurangan hormon androgen). Testosteron atau androgen mempunyai peranan penting pada remodelling tulang.

Testosteron mempengaruhi fungsi dari sel dengan cara berikatan dengan reseptor yang terdapat di sitoplasma. Testosteron berperan dalam mengatur ekspresi faktor pertumbuhan seperti β (TGF- β), insulin-1 (IGF-1) dan protein pengikat IGF (IGF-BP) pada osteoblast yang fungsinya untuk diferensiasi dan proliferasi osteoblast. Testosteron juga menekan aktivitas interleukin (IL)-6, yang berperan mengaktifkan osteoklas dan mendorong resorpsi tulang sehingga defisiensi testosteron meningkatkan aktivitas IL-6 yang dapat menurunkan BMD (*Bone Mineral Density*) (Shigehara *et al.*, 2021). Defisiensi testosteron juga dapat mengaktifkan RANKL dari osteoblas yang mengakibatkan proliferasi dan diferensiasi osteoklas sehingga dapat meningkatkan resorpsi tulang.

Selain testosteron, E2 dan ER α juga memainkan peran penting dalam menjaga BMD. Pada pria pembentukan dan resorpsi tulang dimodulasi oleh testosteron

30% dan estrogen 70%. Testosteron diubah menjadi Estrogen oleh enzim aromatase. E2 berperan mengatur apoptosis dan fungsi osteoklas yang berkontribusi terhadap pemeliharaan BMD. Defisiensi E2 dapat meningkatkan IL-6 yang mengurangi proliferasi dan aktivitas osteoblas sekaligus meningkatkan aktivitas osteoklastik dan meningkatkan ekspresi osteoklastogenesis yang dimediasi oleh reseptor faktor nuklir kappa B (RANK) (Shigehara *et al.*, 2021).

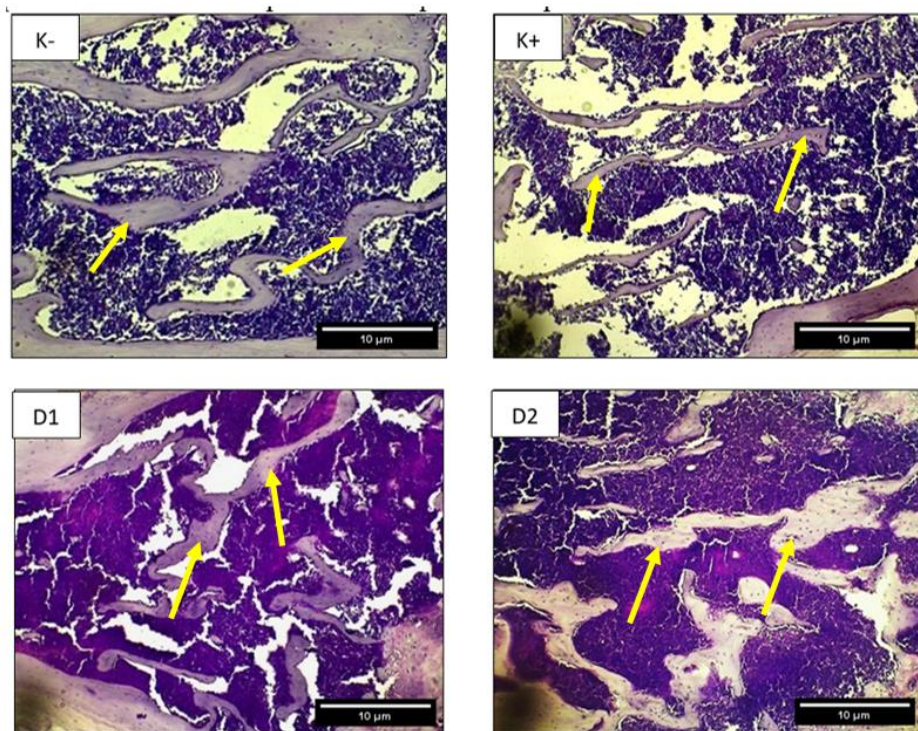
Osteoblas pada penelitian ini banyak ditemukan pada K- dibandingkan K+, sedangkan osteoklas lebih banyak ditemukan pada K+ dibandingkan K-. Semakin banyak osteoblas yang ditemukan pada daerah metafisis tulang, maka kepadatan trabekula tulang juga semakin meningkat. Hal ini menandakan bahwa proses pembentukan tulang yang aktif terjadi di daerah tersebut, sehingga meningkatkan kepadatan tulang. Proses remodeling tulang mempengaruhi pertumbuhan tulang kortikal maupun tulang trabekula. Peningkatan aktivitas sel osteoblas dalam perombakan tulang akan mendorong pembentukan tulang trabekula sebagai tulang baru. Tulang trabekula ini kemudian akan terus berkembang membentuk sistem Haversian, yang pada akhirnya membentuk tulang kortikal. Hasil pengamatan osteoblas dan osteoklas pada K- dan K+ dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Penampang melintang femur mencit pewarnaan HE (perbesaran 1000).
Keterangan: K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), panah kuning menunjukkan osteoblas dan panah merah menunjukkan osteoklas

Pemberian ekstrak tempe kedelai selama 15 hari pada mencit orkidektomi dapat meningkatkan jumlah osteoblast dan ketebalan trabekula dengan semakin meningkatnya dosis (**Tabel 1**). Jumlah osteoklas tidak berbeda nyata walaupun ada kecenderungan jumlah osteoklas menurun dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen tempe kedelai dapat meningkatkan tebal trabekula dan jumlah osteoblast femur. Kedelai mengandung fitoestrogen yang disebut isoflavon. Menurut Astawan *et al.* (2017) isoflavon terdiri dari empat bentuk yaitu aglikon (genistein, daidzein dan glisitein), bentuk glukosida (daidzin, genistin dan glisitin), bentuk asetilglukosida serta bentuk malonilglukosida. Tempe merupakan salah satu olahan dari kedelai yang murah dan mudah diperoleh dengan kandungan fitoestrogen yang sangat bagus. Kandungan isoflavon pada tempe lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai. Hasil penelitian Filipovic *et al.* (2018) menyatakan bahwa tikus Wistar setelah 2 minggu orkidektomi bilateral diberi genistein 30 mg/kg bb setiap hari selama 3 minggu terjadi peningkatan tebal trabekula dan jumlah trabekula. Struktur trabekula femur setelah pemberian ekstrak tempe kedelai dapat dilihat pada **Gambar 2**. Dari

Gambar 2 terlihat bahwa trabekula pada mencit setelah orkidektomi (K+) menjadi lebih tipis dibandingkan kontrol negatif (K-), setelah diberi ekstrak tempe menjadi semakin menebal (D1 dan D2).



Gambar 2. Penampang melintang trabekula femur (panah warna kuning) pewarnaan HE perbesaran 100x

Keterangan: K- (kontrol negatif), K+ (kontrol positif), D1 (dosis 1: 0,6 g/ml/hari), D2(dosis 2: 1,2 g/ml/hari)

Hormon estrogen lebih berperan dalam remodeling tulang pada kondisi defisiensi testosteron (Herrera *et al.*, 2012), sehingga dapat digunakan fitoestrogen eksogen untuk mengatasi penurunan densitas tulang. Fitoestrogen adalah senyawa yang berasal dari tanaman, dengan struktur dan fungsi yang mirip dengan estrogen. Salah satu kelompok dari fitoestrogen disebut isoflavon, yang dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada berbagai jaringan tubuh termasuk tulang.

Isoflavon dapat merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Tempe mengandung isoflavon genistein atau daidzein menimbulkan peningkatan yang signifikan pada sintesis protein, aktivitas alkali fosfatase, dan kandungan DNA dalam osteoblas. Selain efek stimulasi pada pembentukan tulang, isoflavon juga dapat menekan resorpsi osteoklas. Berdasarkan hal tersebut, genistein dapat menginduksi apoptosis osteoklas yang diisolasi dari jaringan femoralis tikus. Daidzein juga dapat menurunkan jumlah osteoklas pada tulang pada tikus (Filipovic *et al.*, 2018).

Pemberian genistein memberikan efek protektif pada tulang trabekula yang menurun karena orkidektomi. Mekanisme molekuler genistein mempengaruhi metabolisme tulang melibatkan jalur yang bergantung pada ER. ER mencakup dua bentuk yaitu ER- α dan ER- β . ER terekspresi pada sitoplasma osteoblas yang

berfungsi untuk menstimulasi diferensiasi serta maturasinya. Selain bekerja pada ER, genistein sebagai inhibitor tirosin memiliki efek penekanan pada osteoklas yang menyebabkan jumlahnya menurun (Filipovic *et al.*, 2018). Daidzein juga mempunyai efek anti-osteoporosis (Sun *et al.*, 2016). Jadi pemberian ekstrak tempe yang mengandung isoflavon genistein dan daidzein dapat memperbaiki struktur tulang yang disebabkan oleh orkidektomi atau defisiensi testosteron. Hasil penelitian ini (**Tabel 1**) menunjukkan pemberian ekstrak tempe kedelai menunjukkan hasil yang positif sampai dosis 0,6 mg/ml/hari karena pada dosis 1,2 mg/ml/hari ketebalan trabekula melebihi kontrol negatif.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak tempe kedelai dosis 0,6 mg/ml/hari secara gavage selama 15 hari dapat menyebabkan peningkatan jumlah osteoblast dan tebal trabekula, serta menurunkan jumlah osteoklast femur mencit orkidektomi. Untuk penelitian selanjutnya disarankan kadar testosteron dan kadar kalsium diukur sebagai data pendukung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LP2M) Universitas Jember yang telah memberikan dana penelitian Hibah KeRis-DiMas Sumber Dana Internal Universitas Jember Tahun Anggaran 2023, dengan surat perjanjian Nomor: 3291/UN25.3.1/LT/2023 tanggal 3 April 2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti, H., & Apriliana, E. (2016). Pengaruh fitoestrogen terhadap gejala menopause. *Majority*, 5 (5), 1–5.
- Astawan M, T. Wresdiyati, L. Maknun. (2017). *Tempe Sumber Zat Gizi dan Komponen Bioaktif untuk Kesehatan*. Bogor: IPB Press.
- Elagizi A, Kohler T, Lavie C. (2017). Testosterone and cardiovascular health. *Mayo Clinic*. Volume 93(1):83–100. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.11.006
- Fatmawati, D., I. Idris, D. K. Sari. (2021). Effect of sterilization of female and male rats on osteocyte cells. *Jurnal Riset Veteriner Indonesia*. Volume 5 No. 2, pp. 47- 52. <https://doi.org/10.20956/jrvi.v5i2.14278>
- Filipovic, B., B. Susic-Jurjevic, V. Ajdzanovic. J.Zivanovic, M. Manojlovic-Stojanoski, N.Nestorovic, N. Ristic, S. Trifunovic & V.Milosevic. (2018). The phytoestrogen genistein prevents trabecular bone loss and affects thyroid follicular cells in a male rat model of osteoporosis. *J. Anal*, 233: 204—212. <https://doi.org/10.1111/joa.12828>
- Fitri, A., R. Rahim, Nurhayati, A.S.L. Pagiling, I. Natsir, A. M.D.N. Simanjuntak, K. Hutagaol, N.E. Anugrah. (2023). *Dasar-dasar Statistika untuk Penelitian*. Penerbit Yayasan Kita Menulis: Medan
- Golds, G., D. Houdek, T. Arnason. (2017). Review Article Male Hypogonadism and Osteoporosis: The Effects, Clinical Consequences, and Treatment of Testosterone Deficiency in Bone Health. *International Journal of Endocrinology*, Volume 2017, 15 pages <https://doi.org/10.1155/2017/4602129>
- Mahriani, R. M. Yuniar, M. Hasanah dan E. T. Utami. (2020). Efek pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap histologi femur pada mencit

- (*Mus musculus*) ovariectomi. *JURNAL BIOLOGI UDAYANA*. 25(1): 39-45.
- Mescher A.L. (2016). Junquiera's Basic Histology. 14th edition. Mc. Graw Hill ed. Lange. New York.
- Herrera, A., A. Lobo-Escolar, J. Mateo, J. Gil, E. Ibarz, L. Gracia. (2012). Male osteoporosis: A review. *World J Orthop*. 18; 3(12): 223-234. doi:10.5312/wjo.v3.i12.223
- Ryu, S.J., D. S. Ryu, J. Y. Kim, J. Y. Park, K. H. Kim, D. K. Chin, K. S. Kim, Y. E. Cho, & S. U. Kuh. (2015). Bone Mineral Density Changes after Orchiectomy using a Scrotal Approach in Rats. *Korean J Spine*, 12(2):55-59. <http://dx.doi.org/10.14245/kjs.2015.12.2.55>
- Shigehara, K., Kouji Izumi, Yoshifumi Kadono and Atsushi Mizokami. Testosterone and Bone Health in Men: A Narrative Review. *J. Clin. Med*. (2021), 10, 530. <https://doi.org/10.3390/jcm10030530>
- Sophocleous, A., & A.I. Idris. (2019). Ovariectomy/Orchiectomy in Rodent. *Methods Mol Biol*. :1914:261-267. DOI: [10.1007/978-1-4939-8997-3_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8997-3_13)
- Sun, M-Y., Y. Ye, L. Xiao, K. Rahman, W. Xiad, H. Zhang. (2016). Daidzein: A Review of Pharmacological Effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 13(3):117-132. http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v13i3.15_117
- Wresdiyati, T., A. Firdaus, M. Astawan. (2021). Tempe and Soybean var. Grobogan-Indonesia Increased The Number of Osteoblasts and Osteocytes, Inhibited Osteoclast Damage in The Tibia Bone of Rats. *Hayati Journal of Biosciences*. Vol. 28 (2): 144-151, DOI:10.4308/hjb.28.2.144