

Efek Glycine Soja Terhadap Angiogenesis dan Histologi Aorta Tikus Ovariektomi

Dwi Yuliawati¹, Wuri Widi Astuti²

Abstrak

Resiko CVD meningkat secara tajam pada menopause yang disebabkan oleh perkembangan aterosklerosis ditandai adanya penebalan intima patologis pada aorta. **Tujuan:** Membuktikan pemberian ekstrak kedelai hitam (Glycine soja) dapat meningkatkan ekspresi VEGF, diameter aorta dan menurunkan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi. Ovariektomi dilakukan untuk membuat hewan model menopause. **Metode:** Tikus dibagi menjadi lima kelompok: Kontrol Negatif, Positif, tiga Perlakuan (dosis 50,100,150 mg/200grBB/hari). Ovariektomi dilakukan pada kelompok kontrol positif dan perlakuan. Tiga puluh hari post ovariektomi, pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak kedelai hitam sesuai dosis selama 30 hari. Terminasi dilakukan untuk pengambilan aorta pada seluruh kelompok. Pemeriksaan ketebalan media intima dan diameter aorta menggunakan HE, sedangkan VEGF menggunakan imunohistokimia. **Hasil:** Uji One Way Anova terhadap diameter aorta dan VEGF, didapatkan $p = 0,000$ ($p < 0,05$), yang berarti terdapat pengaruh signifikan pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap peningkatan diameter dan VEGF aorta tikus ovariektomi. Uji Post Hock Tukey menunjukkan peningkatan diameter aorta dan VEGF signifikan pada seluruh kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol positif. Uji One Way Anova terhadap ketebalan media intima didapatkan $p = 0,410$, yang berarti tidak terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap penurunan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi. Rerata ketebalan terendah terdapat pada kelompok Perlakuan 1 dibawah rerata ketebalan media intima kelompok kontrol positif. **Simpulan:** Pemberian ekstrak kedelai hitam meningkatkan secara signifikan ekspresi VEGF dan diameter aorta, namun tidak berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi.

Kata kunci: diameter aorta, kedelai hitam, ketebalan media intima aorta, VEGF

Abstract

*The risk of CVD increases on menopause due to the development of atherosclerosis, which is characterized by the thickening of pathological intima in the aorta. **Objectives:** To proved black soy extract can increase VEGF expression, aortic diameter and decrease the intima-media thickness in ovariectomy rat aorta. **Methods:** Ovariectomy was performed to make model animal menopause. Rats were divided into five groups: negative control, positive control, three treatments (dose of 50,100,150 mg/200grW/day). Ovariectomy was performed in the positive control and treatment groups. Thirty days post of ovariectomy, black soy extract was given to the treatment group according to the dosage for 30 days. Examination of the thickness of intima-media and the diameter of aorta used HE, while VEGF used immunohistochemistry. **Results:** The One Way Anova test on aortic diameter and VEGF obtained p -value = 0.000 ($p < 0.05$), there was a significant effect of giving black soy extract on the increase in diameter and VEGF. The post hock Tukey test showed a significant increase in the diameter of the aorta and VEGF in all treatment groups compared to the positive control group. The One Way Anova test for the thickness of intima-media obtained a p -value = 0.410, there was no significant effect of giving black soy extract on the decrease in the thickness of the intima-media. The lowest average thickness was in the treatment group 1 below the average thickness of the intima-media in the positive control group. **Conclusion:** Giving of black soy extract significantly increases VEGF expression and the diameter of the aorta, but no significantly in reducing the thickness of intima-media in the ovariectomy rat aorta.*

Keywords: Aortic Intima-Media Thickness, Aortic Diameter, Black soy, VEGF

Afiliasi penulis: ¹Program Studi D3 Kebidanan STIKES Karya Husada Kediri, Indonesia. ²Program Studi D3 Kebidanan STIKES Karya Husada Kediri, Indonesia.

Korespondensi: Dwi Yuliawati, liadil464@gmail.com Telp: 081216656020

PENDAHULUAN

Menopause yang ditandai dengan penurunan produksi hormon ovarium merupakan masa kritis dalam kehidupan wanita¹. Resiko *Cardio Vascular Disease* (CVD) secara umum mengalami peningkatan seiring bertambahnya usia dan akan meningkat tajam pada wanita post menopause². Peningkatan risiko CVD pada menopause disebabkan adanya percepatan perkembangan aterosklerosis³. Aterosklerosis dalam prosesnya melibatkan interaksi antara mekanisme imun dan beberapa zat metabolisme disertai penimbunan lipid pada dinding arteri koroner⁴. Penebalan intimal patologis merupakan gambaran awal perkembangan aterosklerosis yang ditandai dengan akumulasi lipid ekstraseluler pada awalnya, kemudian diikuti oleh infiltrasi makrofag dengan penurunan apoptosis, proteoglikan dan hialuronan pada lipid ekstraseluler⁵. Percobaan penelitian pada hewan model menopause dengan ovariectomi menunjukkan adanya peningkatan ketebalan media intima aorta⁶. Faktor angiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) memberikan efek baik dalam menghambat intimal hiperplasia dan menginisiasi re-endothelisasi setelah kerusakan arteri^{7,8}.

Estrogen diketahui dapat menurunkan risiko penyakit kardiovaskuler. Estradiol melalui ikatan dengan reseptornya berperan dalam promosi migrasi endotel, proliferasi dan peningkatan re-endothelisasi setelah kerusakan sel endotel⁹. Kedelai hitam (*Glycine soja*) merupakan kelompok fitoestrogen yang memiliki khasiat menyerupai hormon estrogen untuk berinteraksi dengan reseptor estrogen. Isoflavon sebagai fitoestrogen utama terdiri dari dua unsur utama yaitu genistein dan daidzein¹⁰. Hasil identifikasi isoflavon total beberapa *legume*, kandungan genistein pada kedelai hitam var Malika sebesar $0,65 \pm 0,07$ mg/g, kedelai kuning var Grobogan sebesar $0,40 \pm 0,01$ mg/g dan kedelai kuning impor sebesar $0,89 \pm 0,06$ mg/g¹¹. Kedelai hitam juga mengandung komponen antosianin yang

tinggi. Diketahui bahwa antosianin adalah subfamili flavonoid yang memiliki struktur molekul mirip dengan estrogen dan memiliki banyak aktivitas biologis¹². Hasil identifikasi antosianin beberapa *legume*, kadar antosianin kedelai hitam var Malika sebesar $222,49 \pm 22,62$ mg/100 gr, sedangkan kadar antosianin pada kedelai kuning var Grobogan dan kedelai kuning impor tidak terdeteksi¹¹. Aktivitas antioksidan kedelai hitam var Malika lebih tinggi dibanding kedelai kuning impor yang disebabkan kandungan isoflavon yang tinggi dan adanya antosianin pada kedelai hitam yang juga berkontribusi pada aktivitas antioksidan¹³.

Beberapa penelitian menunjukkan pengaruh fitoestrogen terhadap fungsi endotel. *Glycine soja* terbukti dapat meningkatkan kadar estradiol dalam darah tikus ovariectomi yang penting sebagai perlindungan terhadap penyakit kardiovaskuler¹⁴. *Vigna unguiculata* yang didalamnya terkandung genistein dapat meningkatkan ekspresi VEGF pada aorta, diameter aorta dan menurunkan ketebalan media intima aorta tikus ovariectomi⁶. Sedangkan *blackcurrant* yang kaya antosianin melalui ikatan dengan reseptor estrogen dapat meningkatkan sintesis *nitric oxide* (NO) melalui *nitric oxide synthase* (eNOS), dimana NO ini berhubungan dengan peningkatan VEGF-A pada *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs)¹⁵. Penelitian bertujuan membuktikan pemberian ekstrak *Glycine soja* dapat meningkatkan ekspresi VEGF, diameter aorta dan menurunkan ketebalan media intima aorta tikus ovariectomi.

METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental murni (*true experimental*) dengan pendekatan *post-test only control group design* yang dilakukan di laboratorium secara *in vivo* pada tikus betina (*Rattus Novergicus*) sebagai hewan coba.

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Biomedik STIKES Karya Husada Kediri; Laboratorium Biokimia, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Materia Medika, Batu. Waktu penelitian yaitu bulan Juni-September 2020.

Kriteria hewan coba yang digunakan adalah Tikus (*Rattus Novergicus*) Strain Wistar jenis kelamin

betina, sehat, usia 2-3 bulan, berat badan 200-400 gram. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari untuk mengetahui kondisi tikus sesuai dengan kriteria. Replikasi penelitian tikus sebanyak 25 ekor yang dibagi menjadi lima kelompok.

Ekstraksi Kedelai Hitam (*Glycine soja*)

Glycine soja didapat dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi), Malang, Jawa Timur, Indonesia. Proses awal ekstraksi dimulai dengan mengeringkan kedelai hitam dalam oven pada suhu 50-70°C. Bahan yang sudah kering dihancurkan dengan blender untuk mendapatkan bubuk kedelai hitam. Kemudian bubuk kedelai hitam direndam dengan etanol 96% sebanyak 900 ml dan dikocok hingga benar-benar tercampur selama satu hari. Proses ini diulangi hingga tiga kali. Hasil rendaman dimasukkan dalam labu evaporasi 1 L. Larutan etanol dibiarkan menguap pada labu evaporasi dan dibiarkan hingga berhenti menetes pada labu penampung (\pm 3 jam untuk satu labu). Hasil ekstraksi berbentuk ekstrak pekat atau pasta. Ekstrak kedelai hitam yang siap, diberikan kepada kelompok tikus perlakuan post ovariektomi 30 hari sesuai dengan dosis perlakuan. Ekstrak kedelai hitam diberikan selama 30 hari dengan pemberian melalui sonde sehari sekali.

Ovariektomi

Ovariektomi dilakukan kepada tikus kelompok kontrol positif dan seluruh kelompok perlakuan untuk mendapatkan tikus model menopause. Ovariektomi terbukti menurunkan kadar estradiol dalam darah tikus untuk mendapatkan hewan model menopause¹⁶. Prosedur awal ovariektomi yaitu dengan menyuntikan anastesi Ketamin 0,2 mg dan Xylazine 0,1 ml terlebih dahulu ke tikus secara intramuskular. Setelah tikus dipastikan tertidur, dilakukan insisi kecil di peritoneal secara transversal pada bagian tengah abdomen sehingga otot abdominal transversum tampak jelas. Setelah diseksi otot, barulah rongga peritoneum dan jaringan adiposa yang meliputi ovarium terlihat. Pengambilan ovarium dilakukan sekaligus dengan satu insisi di ventral abdomen, ovarium kanan dan kiri diambil. Setelah jaringan ovarium diambil kemudian

dilakukan penjahitan dan perawatan pada luka insisi. Tikus di biarkan selama 30 hari post ovariektomi untuk mendapatkan tikus model menopause.

Prosedur Penelitian

Tikus sesuai dengan kriteria dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kontrol positif (dilakukan ovariektomi), 3 kelompok perlakuan (dilakukan ovariektomi dan diberikan ekstrak *Glycine soja* dosis 50mg, 100 mg, 150 /200grBB/hari). Tikus pada kelompok kontrol positif dan perlakuan dilakukan ovariektomi untuk mendapatkan tikus model menopause. Tiga puluh hari post ovariektomi, pada tikus kelompok perlakuan diberikan ekstrak *Glycine soja* sesuai dengan dosis masing-masing kelompok selama 30 hari. Setelah itu tikus pada seluruh kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2 dan P3 dilakukan pembedahan untuk diambil aortanya.

Analisis *Haematoxylin Eosin* (HE)

Jaringan Aorta yang telah dipotong kemudian ditempelkan ke objek *glass (coupes)* dan dilakukan deparafinasi dengan mencelupkan ke dalam xilol selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Eirlich'S Haematoxylin*, alkohol dan juga Eosin Y 1-2% sesuai dengan prosedur. *Coupes* atau slide yang telah siap dibaca di bawah mikroskop cahaya, diamati pada pembesaran 40 x 19 agar dapat dilakukan pengukuran diameter dan tebal media intima Aorta.

Analisis Immunohistokimia (IHC)

Organ yang telah dipotong dan diproses blok parafin, selanjutnya dilakukan blocking dan inkubasi antibodi primer selama 1 hari. Inkubasi antibodi sekunder selama 1 hari berikutnya. *Slide* yang telah selesai di inkubasi kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan lalu tetesi slide dengan entellan dan ditutup dengan *coverblas*. Hasil dapat dilihat esok harinya diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 x dan untuk menghitung persentasenya menggunakan foto *dotslide software* OLYMPUS agar dapat dilakukan pengamatan ekspresi VEGF.

Data ditampilkan dalam bentuk rerata \pm SD. Uji komparatif dengan *One Way Anova* dilanjutkan dengan *Post Hoc Tukey* (LSD 5%) jika hasil signifikan ($p < 0,05$).

Seluruh prosedur penelitian dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian (*Animal Care and Use Committee*) Universitas Brawijaya, Malang dengan Nomor 077-KEP-UB-2020.

HASIL

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Ketebalan Media Intima Aorta Tikus Ovariektomi

Hasil pengamatan ketebalan media intima aorta tikus pada semua kelompok melalui pemeriksaan HE ditunjukkan pada Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Rerata ketebalan media intima aorta

Kelompok Coba	Rerata (μm)	SD	Min. (μm)	Mak. (μm)
Kontrol negatif (K-)	8,45	1,14	7,23	10,19
Kontrol positif (K+)	8,15	0,74	7,43	9,36
P1(50mg/200grBB/ hari)	7,64	1,03	6,79	9,32
P2(100mg/200grBB/ hari)	7,84	0,86	6,88	8,84
P3(150mg/200grBB/ hari)	8,59	0,45	8,20	9,17

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa pada tikus kelompok perlakuan 1 (P1) memiliki rerata ketebalan media intima aorta yang terkecil jika dibandingkan dengan seluruh kelompok. Hasil uji *One Way Anova* dengan tingkat signifikansi $\alpha=0,05$ didapatkan p sebesar 0,410, lebih besar dari tingkat signifikansi $\alpha=0,05$ ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh signifikan pemberian ekstrak *Glycine soja* terhadap penurunan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Diameter Aorta Tikus Ovariektomi.

Hasil pengamatan diameter aorta tikus pada semua kelompok melalui pemeriksaan HE ditunjukkan pada tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Rerata diameter aorta

Kelompok Coba	Rerata (μm)	SD	Min. (μm)	Mak. (μm)
Kontrol negatif (K-)	152,42	5,66	146,34	161,32
Kontrol positif (K+)	101,93	12,27	81,32	113,42
P1(50mg/200grBB/ hari)	125,48	9,36	118,07	141,19
P2(100mg/200grBB/ hari)	138,60	10,76	123,25	149,98
P3(150mg/200grBB/ hari)	150,34	6,32	142,65	158,43

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa pada kelompok perlakuan 3 (P3) memiliki rerata diameter aorta paling tinggi jika dibandingkan dengan rerata kelompok lainnya. Hasil analisis dengan *One Way Anova*, didapatkan p sebesar 0,000, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak *Glycine soja* terhadap peningkatan diameter aorta tikus ovariektomi. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Tukey* guna mengetahui kelompok dengan perbedaan diameter aorta yang signifikan.

Tabel 3. Hasil analisis uji *post hoc Tukey*

Kelompok Coba	Subset for $\alpha=0,05$		
	1	2	3
Kontrol Positif (K+)	101.9300		
P1(50mg/200gr BB/hari)		125.4800	
P2(50mg/200gr BB/hari)		138.6040	138.6040
P3(100mg/200gr BB/hari)			150.3440
Kontrol Negatif (K-)			152.4180
Sig	1.000	.203	.166

Berdasarkan uji diatas diketahui bahwa terjadi peningkatan diameter aorta signifikan pada seluruh kelompok perlakuan dibanding kontrol positif.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Ekspresi VEGF pada Aorta Tikus Ovariectomi

Hasil pengamatan ekspresi VEGF pada aorta tikus pada semua kelompok melalui pemeriksaan immunohistokimia ditunjukkan pada Tabel 4 dibawah ini.

Tabel 4. Rerata ekspresi VEGF

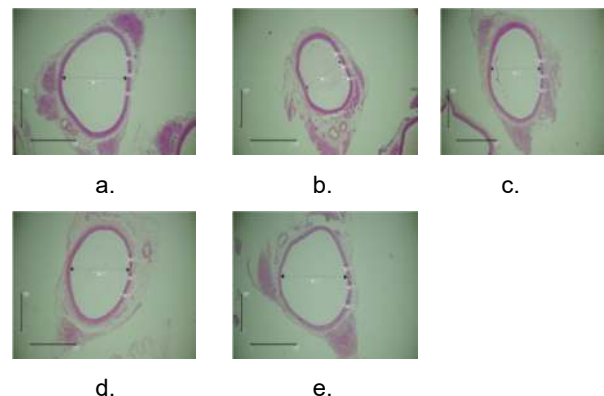
Kelompok Coba	Rerata (μm)	SD	Min. (μm)	Mak. (μm)
Kontrol negatif (K-)	7,80	2,39	5,00	11,00
Kontrol positif (K+)	4,40	1,95	2,00	7,00
P1(50mg/200grBB/ hari)	9,00	1,58	7,00	11,00
P2(100mg/200grBB/ hari)	11,60	1,14	10,00	13,00
P3(150mg/200grBB/ hari)	12,60	2,07	10,00	15,00

Berdasarkan tabel diatas diketahui bahwa pada kelompok perlakuan 3 (P3) memiliki rerata ekspresi VEGF paling tinggi jika dibandingkan dengan rerata kelompok lainnya. Hasil analisis dengan *One Way Anova*, didapatkan p sebesar 0,000, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak *Glycine soja* terhadap peningkatan ekspresi VEGF pada aorta tikus ovariectomi. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc Tukey* guna mengetahui kelompok dengan perbedaan ekspresi VEGF yang signifikan.

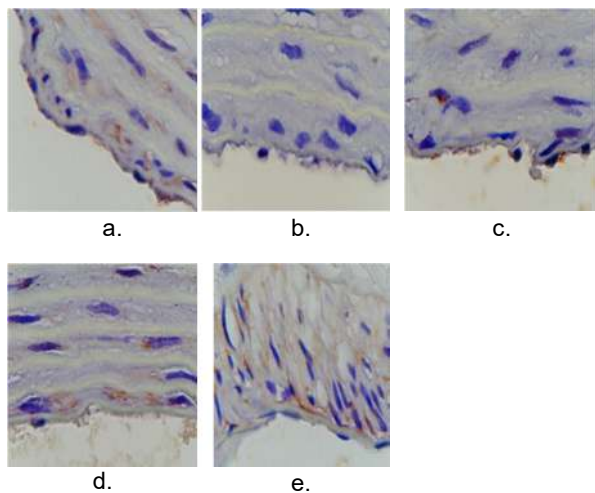
Tabel 5. Hasil analisis uji *post hoc Tukey* 5%

Kelompok Coba	Subset for $\alpha=0,05$			
	1	2	3	4
Kontrol positif (K+)	4.4000			
Kontrol negatif (K-)	7.8000	7.8000		
P1(50mg/200g rBB/hari)		9.0000	9.0000	
P2(100mg/200 grBB/hari)			11.6000	11.6000
P3(150mg/200 grBB/hari)				12.6000
Sig	.065	.847	.223	.914

Berdasarkan uji diatas diketahui bahwa terjadi peningkatan ekspresi VEGF signifikan pada seluruh kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol positif.



Gambar 1. Hasil Analisis *Haemotoxylin Eosin* (a) Kelompok Kontrol negatif (K-); (b) Kelompok Kontrol Positif (K+); (c) Kelompok Perlakuan 1 (P1); (d) Kelompok Perlakuan 2 (P2); (e) Kelompok Perlakuan 3 (P3)



Gambar 2. Hasil analisis IHC (a) Kelompok Kontrol negatif (K-); (b) Kelompok Kontrol Positif (K+); (c) Kelompok Perlakuan 1 (P1); (d) Kelompok Perlakuan 2 (P2); (e) Kelompok Perlakuan 3 (P3)

PEMBAHASAN

Pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan ekspresi VEGF aorta tikus ovariektomi pada semua kelompok perlakuan yaitu dosis 50 mg, 100 mg, 150 mg/ 200 grBB/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan tidak berpengaruh signifikan terhadap penurunan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi. Rerata ketebalan media intima terendah terdapat pada kelompok perlakuan dosis 50 mg/200 grBB/hari dibawah rerata ketebalan media intima pada kelompok kontrol positif. Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang menjadi faktor kunci pada perkembangan aterosklerosis¹⁷. Proses angiogenesis dapat dimulai dari kondisi hipoksia yang menginduksi ekspresi dan pelepasan VEGF dan diturunkan pada saat pemulihan normoxia¹⁸. Faktor-faktor angiogenik (terutama VEGF-A) dan NO terlibat dalam vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah lokal, proteolisis membran basal dan ECM disekitarnya dan gangguan kontak sel¹⁹. VEGF memberikan efek baik dalam menghambat intimal hiperplasia dan menginisiasi re-endothelisasi setelah kerusakan arteri^{7,8}. *Vigna unguiculata* yang didalamnya terkandung genistein sama halnya dengan *Glycine soja* secara signifikan meningkatkan ekspresi VEGF dan menurunkan ketebalan media intima dibandingkan kelompok tikus ovariektomi⁶. *Blackcurrant* yang kaya antosianin

melalui ikatan dengan reseptor estrogen dapat meningkatkan sintesis *nitric oxide* (NO) melalui *nitric oxide synthase* (eNOS), dimana NO ini berhubungan dengan peningkatan VEGF-A pada *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs)¹⁵. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa *Glycine soja* dapat menghambat pembentukan neointimal sebagai akibat peningkatan VEGF pada aorta yang tampak pada peningkatan ekspresi VEGF aorta kelompok perlakuan dosis 50 mg/200 grBB/hari memiliki rerata ketebalan media intima terendah dibandingkan pada kelompok kontrol positif.

Peningkatan diameter aorta tikus ovariektomi secara signifikan ditunjukkan pada semua kelompok perlakuan yaitu dosis 50 mg, 100 mg, 150 mg/ 200 grBB/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Dimeter aorta memiliki korelasi dengan ketebalan lapisan kedua dinding arteri yaitu tunica media, yang lapisannya sebagian besar dibentuk oleh *smooth muscle cells* (SMC) dan komponen *extracellular matrix* (ECM) termasuk elastin, kolagen dan proteoglikan²⁰. Peningkatan rasio *tunica intima/tunica media* (TI/TM) aorta merupakan indikator awal perkembangan aterosklerosis²¹. *Vigna unguiculata* secara signifikan meningkatkan diameter aorta dibandingkan kelompok tikus ovariektomi⁶. Hasil penelitian kami mengindikasikan bahwa *Glycine soja* dapat meningkatkan diameter aorta yang kemungkinan disebabkan adanya peningkatan VEGF yang berperan dalam proteolisis membran basal dan ECM aorta menyebabkan diameter aorta lebih luas pada kelompok perlakuan dibandingkan pada kelompok kontrol positif.

SIMPULAN

Pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) meningkatkan secara signifikan ekspresi VEGF dan diameter aorta, namun demikian tidak berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan ketebalan media intima aorta tikus ovariektomi.

SARAN

Penelitian kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap perkembangan aterosklerosis pada model hewan menopause dengan meneliti variabel lain yang berpengaruh terhadap patologi vaskularisasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ludgero-Correia A Jr, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Faria TS. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL/6 mice. *Nutrition*. 2011; 28: 316-23.
- Taulant M, Clare Oliver- Williams, Setor K, Joop SEL, Bart CJMF, Rajiv C, Maryam K, Oscar HF. Association of age at onset of menopause and time since onset of menopause with cardiovascular outcomes, intermediate vascular traits, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Jama Cardiol*. 2016; 1: 767-776.
- Rossi R, Grimaldi T, Origliani G, Fantini G, Coppi F, Modena MG. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost and Thromb*. 2002; 32: 325-8.
- Tomoko KO, Masafumi Y. Periodontal pathogens and atherosclerosis: Implication of inflammation and oxidative modification of LDL. *BioMed Research International*. 2014:1-7.
- Otsuka F, Miranda CAK, Pier W, Kazuyuki Y, Elena L, Aloke VF, Robert J de W, Frank DK, Thomas NW, Harry RD, Michael J, Renu V. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: a pathology study. *Atherosclerosis*. 2015; 241 (2):772-82.
- Dwi Y, Yuyun Y, Tatit N. Vigna unguiculata reduces aortic intima-media thickness and increases aortic diameter and angiogenesis in ovariectomized rats. *J Exp Integr Med*. 2014; 4(2):85-8.
- Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995; 91: 2793-801.
- Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med*. 1997;3:879-86.
- Kim KH, Young BD, Bender JR. Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *J Mol Cell Endocrinol*. 2014; 389 (1-2): 65-70.
- Izabela WP, Chiara M, Dorota B, Ilona KZ, Tomasz W, Dariusz JS. Divers effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as model. *Hindawi*. 2013;1:1-15.
- Nurrahman. Evaluasi komposisi gizi dan senyawa antioksidan kedelai hitam dan kuning. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2015; 4(3): 85-93.
- Lee YM, Yoon Y, Yoon H, Park HM, Song S, Yeum KJ. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients*. 2017; 9 (10): 1089-115.
- Nurrahman, Mary A, Suparmo, Marsetyawan HNES. Pertumbuhan jamur, sifat organoleptik dan aktifitas antioksidan tempe kedelai hitam yang diproduksi dengan berbagai jenis inokulum. *Agritech*. 2012; 32(1):60-5.
- Dwi Y, Wuri WA, Fitri Y. Effect of Black Soy phytoestrogens (Glycine soja) on elevated levels of estradiol in rat blood (*Rattus novergicus*) Ovariectomy. *Nusantara Bioscience*. 2020; 12(1): 55-8.
- Horie K, Naoki N, Hayato M. Phtoestrogenic effects of blackcurrant anthocyanins increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in human endothelial cells and ovariectomized rats. *Moleculs*. 2019; 24(7): 1259-89.
- Dwi Y, Wuri WA, Fitri Y. Pengaruh Ovariectomi terhadap kadar estradiol dalam darah tikus (*Rattus novergicus*) model menopause. *Jurnal Ilmu Kesehatan*. 2019; 10(2): 95-102.
- Rivera LB, Bergers G. Angiogenesis: Targeting vascular sprouts. *J Science*. 2014; 344 (6191): 1449-50.

18. Edward MC, Desire C, Peter C. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research*. 2001;4(3):507-21.
19. Michael P, Holger G, Peter C. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011; 146: 873-87.
20. Caroline C, Melanie P, Anne NS, Robert S.. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biology*. 2017;12:18-34.
21. Adam SK, Das S, Jaarin K. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. *Int J Exp Path*. 2009; 90: 321-7.