

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TEMPE TERHADAP JUMLAH FOLIKEL  
OVARIUM PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) BETINA STRAIN WISTAR**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



**Oleh:**

**Qatrunnada Naqiyyah Khusmitha**

**NIM 145070601111012**

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

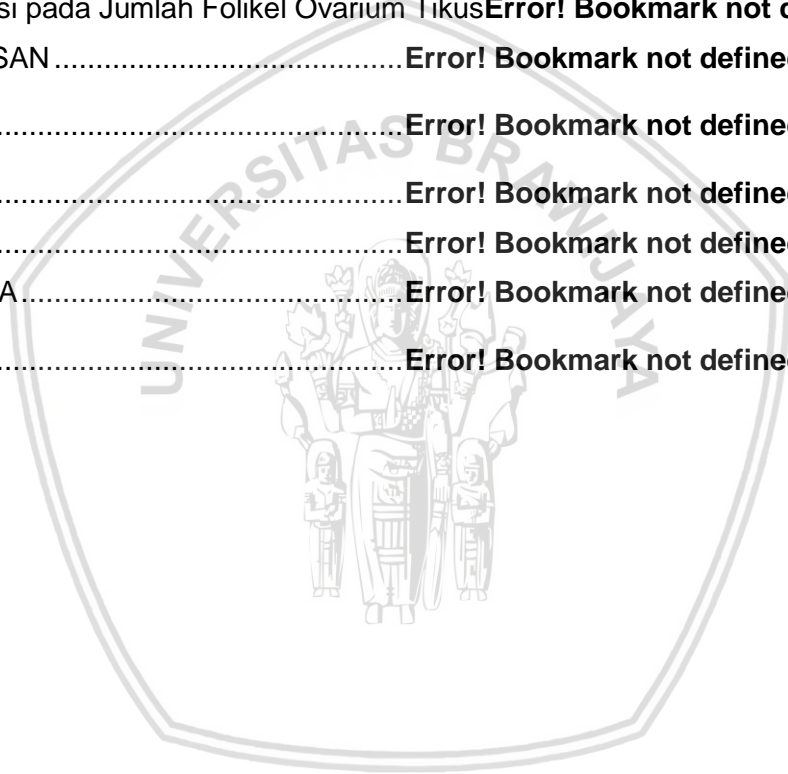
**2018**

## DAFTAR ISI

COVER.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
KATA PENGANTAR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ABSTRAK.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<i>ABSTRACT</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR ISI.....	2
DAFTAR GAMBAR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR TABEL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR LAMPIRAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR SINGKATAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB 1 PENDAHULUAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1 Latar Belakang.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2 Rumusan Masalah.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3 Tujuan Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.1 Tujuan Umum.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.2 Tujuan Khusus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4 Manfaat Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.1 Manfaat Akademik.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.2 Manfaat Praktis.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1 Ovarium.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 Folikel Ovarium.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.1 Folikel Primer.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.2 Folikel Sekunder.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.3 Folikel de graff.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.4 Folikel Atresia.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 Gangguan Ovulasi.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4 Tempe.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

2.5 Fitoestrogen .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.1 Fitoestrogen dan Isoflavon .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.5.2 Absorpsi dan Ikatan Fitoestrogen.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6 Tikus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.1 Pengertian Tikus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.2 Klasifikasi Tikus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.3 Reproduksi Tikus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6.4 Pengaturan Hormonal pada Siklus Estrus	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Keterangan Kerangka Konsep.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3 Hipotesa Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2 Populasi dan Sampel.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3 Variabel Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.1 Bahan Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.6 Definisi Operasional .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7 Prosedur Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.1 Persiapan Hewan Coba .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.2 Pembagian Kelompok Sampel .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.3 Pembuatan Ekstrak Tempe.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.4 Pengenceran Ekstrak Tempe.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.5 Penentuan Fase.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.6 Pemberian Perlakuan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.7 Pengumpulan Sampel.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.7.8 Penentuan Jumlah Folikel .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.8 Alur Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.9 Analisis Data .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

5.1 Hasil Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.1.1 Hasil Pengamatan Mikroskopis Ovarium Tikus Putih Setelah Pemberian Ekstrak Tempe.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2 Analisis Data .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.1 Pengujian Normalitas Data Jumlah Folikel Ovarium Tikus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2 Pengujian Perbedaan Pengaruh Ekstrak Tempe Terhadap Jumlah Folikel Ovarium pada Tikus Putih Strain Wistar .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2.1 Uji <i>Kruskal Wallis</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2.2 Uji <i>Mann Whitney</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2.2.3 Korelasi pada Jumlah Folikel Ovarium Tikus.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB 6 PEMBAHASAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB 7 PENUTUP.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.1 Kesimpulan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2 Saran.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR PUSTAKA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
LAMPIRAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TEMPE TERHADAP JUMLAH FOLIKEL  
OVARIUM PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) BETINA STRAIN  
WISTAR**

Oleh:

**Qatrunnada Naqiyah Khusmitha**

**NIM 145070601111012**

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 12 April 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

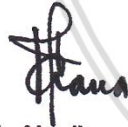
Penguji-I

dr. Sutrisno, Sp. OG (K)

NIP. 19680203 199803 1 005

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,



Dr. dr. Nurdiana M. Kes

NIP. 199510151986032001



Ningrum Paramita Sari, S. Keb. Bd.,  
M. Biomed

NIK. 2012038707032001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S1 Kebidanan,

Linda Ratria Wati, SST, M. Kes

NIP. 199409132014042001



## ABSTRAK

Khusmitha, Q.N. 2018. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Tempe Terhadap Jumlah Folikel Ovarium pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Betina Strain Wistar*. Tugas Akhir, Program Studi Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr.dr. Nurdiana M.Kes, (2) Ningrum Paramita Sari, S.Keb, Bd., M.Biomed

Ovarium merupakan organ reproduksi primer perempuan. Sebesar 25% penyebab infertilitas pada perempuan adalah gangguan ovulasi yang dapat dipengaruhi oleh diet. Tempe merupakan salah satu produk kedelai yang mengandung fitoestrogen dan dapat mempengaruhi reproduksi perempuan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap jumlah folikel ovarium pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar dengan desain eksperimental murni. Tikus usia 4 minggu berjumlah 28 ekor dibagi menjadi 4 kelompok dengan dosis per hari: Kontrol (P0); Perlakuan 1 (P1)= 7,5 mg/200grBB; Perlakuan 2 (P2)= 15 mg/200grBB; Perlakuan 3 (P3)= 30 mg/200grBB. Ekstrak tempe diberikan selama 28 hari dan pada hari ke 28 saat fase estrus dibedah, diambil ovariumnya untuk dihitung jumlah folikel primer, sekunder, de graff, dan atresia. Hasil rata-rata jumlah folikel primer: P0= 19.00±7.71; P1= 16.08±11.22; P2= 15.00±4.93; P3= 16.89±5.231. Rata-rata jumlah folikel sekunder: P0= 2.64±2.42; P1= 2.50±2.68; P2= 1.90±2.08; P3= 1.89±0.93. Rata-rata jumlah folikel de graff: P0= 0.09±0.30; P1= 0.25±0.45; P2= 0.50±0.53; P3= 0.22±0.44. Rata-rata jumlah folikel atresia: P0= 5.91±3.15; P1= 6.50±4.52; P2= 8.90±5.55; P3= 7.89±3.92. Analisa *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang tidak signifikan ( $p>0,05$ ) pada: jumlah folikel primer:  $p\text{-value}= 0,489$ ; jumlah folikel sekunder:  $p\text{-value}= 0,894$ ; jumlah folikel de graff:  $p\text{-value}= 0,206$ ; jumlah folikel atresia:  $p\text{-value}= 0,474$ . Uji *Mann Whitney* menunjukkan hasil yang signifikan pada folikel de graff kelompok kontrol dengan kelompok P2 ( $p\text{-value}= 0,043$ ). Terdapat adanya tren penurunan folikel primer dan sekunder pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol dan peningkatan pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol pada folikel de graff dan atresia.

**Kata kunci:** fitoestrogen, ekstrak tempe, folikel ovarium

## ABSTRACT

Khusmitha, Q.N. 2018. *Effect of Giving Tempeh Extract to Number of Follicle Ovari on Female Rat (Rattus norvegicus) Strain Wistar*. Final Project, Midwifery Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr.dr. Nurdiana M.Kes, (2) Ningrum Paramita Sari, S.Keb, Bd., M.Biomed

Ovaries are primary female reproductive organs. 25% of infertility in woman caused by ovulation disorder which can be caused by diet. Tempeh is soy product that contains phytoestrogens and that can be affect female reproduction. The purpose of this study was to investigate the effect of tempeh extract on the number of ovarian follicle in rat (*Rattus norvegicus*) strain wistar with true experimental design. 28 rat with age 4 weeks divided to 4 groups with doses per day: Control (P0); Treatment 1 (P1)= 7,5 mg/200grBB; Treatment 2 (P2)= 15 mg/200grBB; Treatment 3 (P3)= 30 mg/200grBB. Tempeh extract given for 28 days and after it when estrous cycle, the ovaries are taken to be observed number of primary follicles, secondary follicles, graafian follicles and atretic follicle. Obtain result in the average number of primary follicle: P0= 19.00±7.71; P1= 16.08±11.22; P2= 15.00±4.93; P3= 16.89±5.231. The average number of secondary follicle: P0= 2.64±2.42; P1= 2.50±2.68; P2= 1.90±2.08; P3= 1.89±0.93. The average number of graafian follicle: P0= 0.09±0.30; P1= 0.25±0.45; P2= 0.50±0.53; P3= 0.22±0.44. The average number of atretic follicle: P0= 5.91±3.15; P1= 6.50±4.52; P2= 8.90±5.55; P3= 7.89±3.92. Kruskal-Wallis analysis shows that were not significantly ( $p>0,05$ ) on number of primary follicle:  $p$ -value = 0,489; number of secondary follicle:  $p$ -value= 0,894; number of graafian follicle:  $p$ -value= 0,206; number of atretic follicle:  $p$ -value= 0,474. Mann Whitney analysis shows there were significantly on graafian follicle between control group with P2. There is a trend of primary follicle and secondary follicle loss in treatment group compared with control group and an increased in graafian follicle and atretic follicle in treatment group compared with control group.

**Keywords:** phytoestrogens, tempeh extract, ovarian follicles

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Ovarium merupakan organ reproduksi primer pada perempuan (Sloane, 2003). Perempuan mempunyai dua buah ovarium yaitu bagian kanan dan kiri yang pada dewasa ukurannya mencapai sebesar ibu jari tangan (Hestiantoro, 2014). Ovarium memiliki dua peran yakni untuk memproduksi hormon yang dibutuhkan dalam dukungan sistem endokrin dan oosit matur yang siap untuk difertilisasi serta berperan dalam separuh penyusunan genetik pada organisme baru (Cordeiro, et al., 2015).

Folikel ovarium merupakan unit fungsionalis dari ovarium yang berfungsi dalam dua peranan dari ovarium. Folikel ovarium akan memproduksi hormon steroid dan protein secara siklis sebagai respon terhadap hipotalamus dan pituitari. Hormon tersebut akan mendukung folikel dan mendukung pertumbuhan serta perkembangan oosit yang berhubungan dengan kesehatan reproduksi (Cordeiro, et al., 2015).

Gangguan sistem hormonal dapat menyebabkan terjadinya gangguan pada proses ovulasi dan fertilisasi. Zat-zat estrogenik dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan sel folikel dan mencegah terjadinya proses ovulasi (Syari, 2012). Gangguan pada ovulasi merupakan penyebab utama dari infertilitas pada perempuan yaitu sebesar 25% (Sumapraja & Wiweko, 2014).

Anovulasi terjadi akibat gangguan pada kelenjar pituitari atau akibat kegagalan fungsi dari ovarium yang juga berkaitan dengan adanya



gangguan hormon yang terjadi (Aiman, 1984). Infertilitas pada perempuan dan laki-laki dapat disebabkan karena gangguan hormon, faktor genetik, kelainan kongenital, dan faktor lingkungan termasuk diet makanan yang dapat menyerang gen berkaitan dengan metabolisme atau produksi hormon (Sreenivasan, 2015).

Tempe merupakan bahan makanan yang dihasilkan dari fermentasi kacang kedelai atau jenis kacang lain dengan menggunakan jamur *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*. Pembuatan tempe adalah salah satu industri rakyat Indonesia (Dwinaningsih, 2010). Menurut Badan Standarisasi Nasional (BSN) (2012), terdapat 81 ribu usaha pembuatan tempe di Indonesia yang mampu memproduksi 2,4 juta ton tempe per tahun.

Konsumsi tempe di Indonesia memiliki rata-rata sekitar 6,45 kg per orang per tahun. Konsumsi kacang kedelai beserta olahannya rata-rata dikonsumsi oleh penduduk Indonesia sebesar 52,7 gram per orang per hari, dimana hal ini menyumbang 92,9 persen dari berat total rerata kacang-kacangan yang dikonsumsi oleh penduduk Indonesia. Konsumsi kacang-kacangan termasuk tempe ini dikonsumsi tertinggi kedua setelah serelia di provinsi Jawa Barat, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, dan Jawa Timur (Siswanto, 2014).

Tempe merupakan produk olahan kedelai yang memiliki kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi (Carmichael, et al., 2011). Isoflavon merupakan komponen terpenting dari fitoestrogen. Kedelai dan produk kedelai merupakan penghasil utama dari isoflavon pada makanan. Kedelai mengandung 12 jenis fitoestrogen termasuk daidzein, genistein, dan glisitein

yang merupakan bagian dari aglikon (fitoestrogen yang tidak terikat) (Cvejic', et al., 2012).

Kandungan isoflavon pada produk kedelai nonfermentasi lebih besar 2-3 kali dibandingkan dengan produk kedelai fermentasi, akan tetapi tempe memiliki aglikon yang besar (Cvejic', et al., 2012). Kadar genistein pada ekstrak tempe dilaporkan lebih besar 5 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak susu kedelai (Fawwaz, et al., 2017). Jumlah aglikon yang tinggi ini disebabkan karena adanya hidrolisis selama fermentasi (Cvejic', et al., 2012). Kandungan dalam 100 gram bahan tempe didapatkan adanya isoflavon total sebanyak 60,61 mg, daidzein 22,66 mg, genistein 36,15 mg dan glisitein 3,82 mg (Bhagwat, et al., 2008).

Isoflavon merupakan suatu zat kimia yang serupa dengan estrogen (Suparman, 2014) yaitu  $17\beta$ -estradiol (Primiani, 2013). Fitoestrogen dapat memiliki sifat estrogenik dan antiestrogenik. Fitoestrogen telah disamakan dengan *selective estrogen receptor modulators* (SERMs) alami (Carmichael, et al., 2011). Fitoestrogen pada keadaan estrogen normal, akan mengikat RE (Reseptor Estrogen) dan bersifat antagonis terhadap estrogen (Cvejic', et al., 2012). Manfaat dan bahaya dari fitoestrogen bagi kesehatan masih belum terpecahkan. Hal ini memiliki jawaban yang kompleks dan dapat bergantung pada usia, status kesehatan dan ada tidaknya mikroflora usus (Patisaul & Jefferson, 2010).

Hasil penelitian Sindarti (2016) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kedelai dalam jumlah yang berbeda dapat menurunkan jumlah folikel dan dalam penelitian Prabowo (2014) menunjukkan hasil penurunan

jumlah folikel ovarium pada pemberian ekstrak kedelai dengan dosis yang lebih tinggi dari 7,5 mg/200 gBB yaitu pada pemberian mulai 10 mg/200gBB.

Oleh karena itu, perlu diteliti apakah ekstrak tempe dapat mempengaruhi jumlah folikel ovarium. Penelitian ini dilakukan hewan coba tikus putih betina strain wistar.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah pemberian ekstrak tempe dapat menurunkan jumlah folikel ovarium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap penurunan jumlah folikel ovarium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1.3.2.1 Mengetahui jumlah folikel ovarium pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang telah diberikan ekstrak tempe dalam berbagai dosis.

1.3.2.2 Mengetahui hubungan dosis ekstrak tempe dengan jumlah folikel ovarium pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Akademik**

1.4.1.1 Memberi dasar pengembangan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh konsumsi tempe terhadap ovarium dalam makanan sehari-hari.

1.4.1.2 Sebagai acuan bagi penelitian yang lebih mendalam mengenai pengaruh konsumsi tempe terhadap jumlah folikel ovarium.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Sebagai sumber informasi yang memberi masukan kepada masyarakat tentang pengaruh tempe yang mengandung isoflavon terhadap jumlah folikel ovarium.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

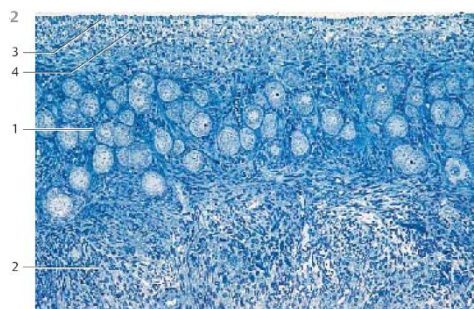
#### 2.1 Ovarium

Ovarium merupakan organ reproduksi primer pada perempuan (Sloane, 2003). Perempuan biasanya memiliki dua buah ovarium yaitu bagian kanan dan kiri. Ovarium pada dewasa berukuran sebesar ibu jari tangan dengan ukuran panjang sekitar 4 cm, lebar dan tebal sekitar 1,5 cm (Hestiantoro, 2014).

Struktur ovarium terdiri dari korteks dan medula. Korteks adalah bagian luar yang dilapisi oleh epitel germinativum berbentuk kubik dan terdiri dari stroma dan folikel primordial. Medula merupakan bagian dalam korteks dan dapat ditemui adanya stroma dengan pembuluh darah, serabut saraf, dan sedikit otot polos (Sofowon, 2014).

Mesovarium pada korteks ovarium diikuti oleh *squamous peritoneal epithelium*. Lapisan sel dan jaringan pada tunika albuginea dibawah permukaan epitel tidak terdapat adanya folikel ovarium. Lapisan ini akan diikuti oleh Stroma korteks (*zona parenchymatosa*) yang mengandung jaringan ikat, *myofibroblasts* dan sel kelenjar intersisial yang mengandung folikel primordial dan folikel primer (Kuehnel, 2003).





**Gambar 2.1 Korteks Ovarium** (Kuehnel, 2003).

Keterangan: (1) Stroma korteks dengan banyak folikel primordial dan folikel primer; (2) medulla ovarium (zona vasculosa); (3) permukaan epitel; (4) tunica albuginea. Irisan semi tipis. Pewarnaan: *methylene blue-azure II*. Pembesaran: 200x.

Ovarium memiliki dua peran yakni untuk memproduksi hormon yang dibutuhkan dalam sistem endokrin individu dan menghasilkan oosit matur yang dapat difertilisasi serta berperan dalam separuh pembantuan genetik dari individu baru. Folikel ovarium merupakan unit fungsionalis dari ovarium yang membawa dua tujuan tersebut. Folikel pada ovarium dewasa memproduksi hormon steroid dan protein dalam siklus sebagai respons terhadap faktor tropis dari hipotalamus dan pituitari. Hormon tersebut akan melakukan *support* lokal terhadap folikel dan pertumbuhan serta perkembangan oosit (Cordeiro, et al., 2015).

Bayi perempuan saat dilahirkan memiliki sekitar 750.000 oogonium. Jumlah ini akan berkurang akibat dari pertumbuhan dan degenerasi folikel. Pada umur 6-15 tahun ditemukan 439.000, 159.000 pada 16-25 tahun, diantara umur 26-35 tahun menurun sampai 59.000 dan 34.000 pada usia 34-45 tahun. Semua folikel akan ditemui hilang pada masa menopause (Anwar, dkk., 2014). Tiap bulan 1-2 folikel tersebut akan dikeluarkan dan akan berkembang menjadi folikel de Graff (Prawirohardjo, 2014).

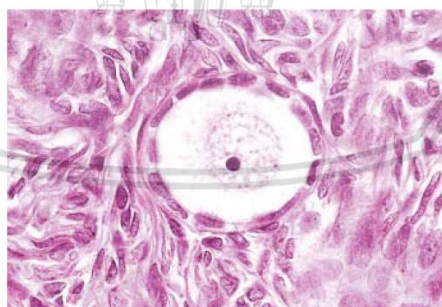
Folikel merupakan bagian terpenting dari ovarium dan berada di bagian korteks ovarium dalam letak dan perkembangan yang berbeda-beda.

Oosit yang dikelilingi oleh satu lapisan sel sampai menjadi folikel de graff akan terisi oleh likuor follikuli yang mengandung estrogen dan siap untuk berovulasi. Folikel de graff pada saat ovulasi akan mendekati permukaan ovarium yang pecah dan akan melepaskan ovum. Sel granulosa dan korona radiata akan dilepas dari ovum. Sebelum pelepasan, ovum akan mengalami dua tahap pematangan sebagai persiapan untuk dibuahi (Sofowan, 2014).

## 2.2 Folikel Ovarium

### 2.2.1 Folikel Primer

Folikel primer dapat ditandai dengan adanya sel folikuler yang membentuk lapisan sel granulosa disekitar oosit dan adanya zona pelusida yang jelas. Proses perkembangan utama pada folikel primer adalah ekspresi reseptor FSH dan pertumbuhan serta diferensiasi oosit. Oosit primer tergolong rentan terhadap kerusakan pada waktu usia tua sehingga memiliki resiko anak dengan kelainan kromosom pada usia tua (Kuehnel, 2003; Coad & Dunstall, 2006).



**Gambar 2.2 Folikel primer unilaminar** (Kuehnel, 2003)

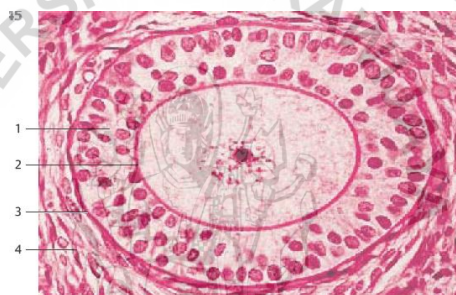
Keterangan: Sel epitel berlapis tunggal kuboid atau kolumnar. Zona pelusida berada diantara membran plasma oosit dan epitel folikular. Sel teka folliculi (membran basal dan selubung jaringan ikat) menyelimuti folikel primer. Pewarnaan: hematoxylin-eosin; pembesaran: x500.

Perkembangan folikel primer unilaminar ditandai dengan adanya perubahan diameter oosit yang meningkat dari ukuran  $\sim 25\mu\text{m}$  menjadi  $\sim 120\mu\text{m}$ . Faktor pertumbuhan yang dihasilkan oosit memiliki peran dalam



mengatur folikulogenesis preantral termasuk dalam merangsang proliferasi sel granulosa dan perkembangan sel teka (Kuehnel, 2003).

Sel folikel unilaminar akan berproliferasi membentuk epitel folikel bertingkat yang disebut dengan sel granulosa. Folikel tersebut akan disebut folikel primer multilaminar. (Kuehnel, 2003). Perkembangan folikel tersebut juga akan diikuti oleh neoformasi dari pembuluh-pembuluh darah kecil melalui proses angiogenesis. Sirkulasi darah akan terdapat mengelilingi folikel membawa gonadotropin dan nutrisi ke dalam, serta sisa dan hasil sekresi dari folikel yang sedang berkembang (Coad & Dunstall, 2006).



**Gambar 2.3 Folikel primer multilaminar** (Kuehnel, 2003)

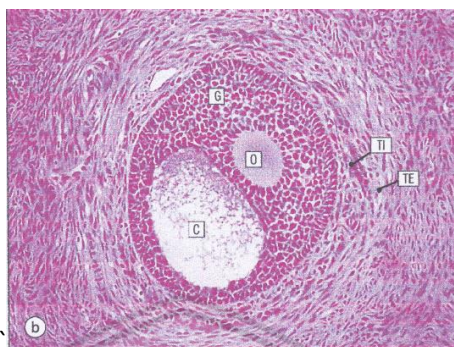
Keterangan: 1 Epitel Foikel; 2 Zona pellucida; 3 Membran basal; 4 Teka folliculi. Pewarnaan: hematoxylin-eosin; pembesaran: x 300

Folikel primer multilaminar dapat mencapai ukuran 400 $\mu$ m. Zona pelusida berada diantara membran plasma dari oosit dan epitel granulosa. Sitoplasma ovarium ditemui jarang bergranula. Sel inti besar berisi nukleus akan menonjol (Kuehneel, 2003).

### 2.2.2 Folikel Sekunder

Perkembangan folikel primer akan berpindah ke dalam korteks ovarium. Folikel sekunder akan mengalami pembentukan ruang-ruang kecil diantara lapisan granulosa. Sel-sel tersebut akan mengeluarkan cairan folikel (antrum). Cairan antrum mengandung asam hialuronik GAG yang besar, terdapat adanya faktor pertumbuhan, plasminogen, fibrinogen, anti koagulan

heparin sulfat, proteoglikan, dan steroid konsentrasi tinggi (progesteron, androstenadion dan estrogen) dengan protein pengikatnya (Mescher, 2016).



**Gambar 2.4 Folikel Sekunder** (Lowe & Anderson, 2008)

Keterangan: Terdapat perkembangan proliferasi sel granulosa (G), munculnya cairan pada cavitas (antrum) (C), sel stroma disekitar folikel yang membentuk bagian dalam terdiri dari sel yang lebih besar (teka interna) (TI) dan bagian lapisan luar dari sel gelendong yang lebih kecil (teka eksterna) (TE)

### 2.2.3 Folikel de graff

Perkembangan folikel de graff (folikel antral/folikel tersier) ditandai dengan adanya suatu ruang (kavitas) atau antrum yang lebih besar dan dapat bertambah hingga 2 cm. Sel granulosa akan membentuk gundukan kecil dan menyorok ke antrum yang disebut kumulus oophorus. Sel granulosa tersebut akan mengelilingi zona pelusida membentuk korona radiata yang akan mengiringi oosit saat ovulasi meninggalkan ovarium (Mescher, 2016).

Folikel yang matang saat dilihat menggunakan *ultrasound* akan membentuk tonjolan pada permukaan ovarium. Lapisan granulosa pada folikel ini menjadi tipis karena sel-selnya tidak berkembang sebanding dengan pertumbuhan antrum. Folikel de graff memiliki lapisan sel teka yang lebih tebal dibandingkan folikel sekunder (Mescher, 2016).

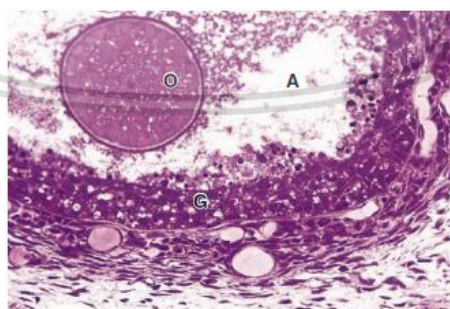


**Gambar 2.5 Folikel de Graff (Mescher, 2016)**

Keterangan: (A) Antrum, (O) Oosit, (CR) Korona radiata, (CO) Kumulus oophorus, (G) Sel granulosa, (TI) Sel teka interna, (TE) Sel teka eksterna. Pembesaran: 100x, PT.

#### 2.2.4 Folikel Atresia

Sebagian besar folikel akan mengalami proses degenerasi yang disebut dengan atresia. Atresia akan terjadi saat sel folikel dan oosit mati, dan akan dibuang oleh sel fagositik (Mescher, 2016). Atresia dapat terjadi pada seluruh fase perkembangan folikel (Lowe & Anderson, 2008). Atresia melibatkan proses apoptosis dan pelepasan sel granulosa, autolisis pada oosit dan runtuhnya zona pelusida. Makrofag akan menyerang folikel yang berdegenerasi dan fagositosis bahan apoptosis dan bagian-bagian lain (Mescher, 2016).



**Gambar 2.6 Folikel Atresia (Mescher, 2016)**

Keterangan: Folikel atresia ditandai dengan pembentukan antrum yang besar. Terdapat adanya apoptosis pada sel granulosa (G) dan autolysis oosit. Sisa apoptosis yang lepas dapat terlihat pada antrum (A). Korona radiata sudah hilang dan meninggalkan degenerasi oosit. Pembesaran: 200x, PT.

### 2.3 Gangguan Ovulasi

Ovarium memiliki fungsi sebagai penghasil oosit dan penghasil hormon. Masalah pada fungsi ovulasi berkaitan dengan fertilitas. Gangguan ovulasi ditemukan pada 20% wanita yang mengalami infertilitas. Terdapat 3 tipe anovulasi WHO yaitu tipe 1, tipe 2 dan tipe 3. Anovulasi tipe 2 WHO merupakan jenis yang paling sering muncul dimana kadar gonadotropin serum dalam batas normal (Gaba & Bhattacharya, 2015) yaitu sebesar 85% wanita yang mengalami gangguan ovulasi.

Kondisi yang termasuk anovulasi tipe 2 adalah *Polycystic Ovary Syndrome* (PCOS) dan hiperprolaktinemia *amenorrhea* (Clinical guideline [CG11], 2013). Sindrom ovarium polikistik merupakan masalah gangguan ovulasi utama yang sering dijumpai pada kasus infertilitas (Sumapraja & Wiweko, 2014). Penyebab dari PCOS masih belum jelas namun ada kemungkinan berasal dari multifaktor dengan penyebab genetik (Baird, et al., 2012). PCOS muncul sebanyak tiga perempat kasus dan terdiri dari kelompok heterogen yang memiliki gejala menstruasi tidak teratur, hirsutisme dan obesitas dengan infertilitas.

Penyebab lain dari anovulasi adalah hipogonadotropik dan hipogonadisme (Anovulasi tipe 1 WHO) (Gaba & Bhattacharya, 2015) yang disebabkan oleh kegagalan kelenjar pituitari dan ditandai oleh adanya *amenorrhoea* (primer dan sekunder). Amenorrhea hipotalamus seringkali disebabkan penurunan berat badan atau olahraga (Clinical guideline [CG11], 2013).

Anovulasi tipe 3 WHO atau hipergonadotropik hipogonadisme (Gaba & Bhattacharya, 2015) disebabkan oleh adanya kegagalan dari ovarium

(Clinical guideline [CG11], 2013). Rendahnya kadar gonadotropin akan melepaskan agonis hormon yang memicu terjadinya penurunan kadar estradiol, *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *lutensizing hormone* (LH). Anovulasi juga dapat terjadi pada perempuan dengan hiperprolaktinemi dimana kadar gonadotropin dan estrogen yang rendah (Gaba & Bhattacharya, 2015).

Masalah gangguan ovulasi lainnya adalah pertumbuhan kista ovarium non-neoplastik atau kista ovarium neoplastik. Kista ovarium yang sering dijumpai adalah kista endometrium atau kista cokelat. Kista endometriosis tidak hanya berkaitan dengan gangguan fungsi ovulasi, namun juga berkaitan dengan fungsi maturasi oosit (Sumapraja & Wiweko, 2014). Gangguan ovulasi juga berkaitan dengan gangguan pada hipotalamus, pituitari anterior atau ovarium. Hal ini berkaitan dengan gaya hidup seperti aktivitas, gangguan makan atau stress (Hoffman, et al., 2012).

Infertilitas merupakan masalah yang dihadapi oleh pasangan yang telah menikah minimal satu tahun, melakukan senggama teratur, tanpa menggunakan kontrasepsi namun belum berhasil memperoleh kehamilan. Diperkirakan 10% dari pasangan mengalami kesulitan untuk mendapatkan keturunan. Infertilitas dapat diakibatkan oleh faktor perempuan. Salah satu faktor perempuan tersebut adalah adanya gangguan pada ovulasi (Sumapraja & Wiweko, 2014) yang terjadi sekitar lebih dari 50% kasus (Sudha & Reedy, 2013; Masoumi, et al., 2015).

#### 2.4 Tempe

Tempe merupakan makanan tradisional yang telah lama dikenal di Indonesia (Sarwono, 2010). Proses fermentasi dalam pembuatan tempe

diperani oleh ragi. Tempe dapat dikonsumsi setelah diberikan bumbu (pada umumnya diberikan bawang putih, garam, dan ketumbar) dan kemudian digoreng. Selain itu, tempe juga dapat diolah menjadi keripik tempe, tepung makanan suplemen balita (TFR = *Tempeh Fish Rice*), selai, kecap, dan berbagai produk olahan lainnya (Suprapti, 2007).



**Gambar 2.7 Tempe Kedelai (BSN, 2012)**

Tempe kedelai adalah produk berbentuk padatan kompak berwarna putih, yang diperoleh dari kedelai kupas yang sudah direbus dan difermentasi menggunakan kapang *Rhizopus spp* (BSN, 2015). Ragi yang terdapat dalam pembuatan tempe adalah *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus chlamdosporus*, dan *Rhizopus arrhizus*. *Rhizopus oligosporus* lebih banyak mensintesis enzim pemecah protein (protease) dan *Rhizopus oryzae* lebih banyak mensintesis enzim pemecah pati (alfa amilase) selama proses fermentasi. Kedua jenis ragi ini digunakan dalam pembuatan tempe dengan kadar *Rhizopus oligosporus* lebih banyak yaitu dengan perbandingan 1:2 (Sarwono, 2010).

Tempe memiliki ciri berwarna putih, tekstur kompak dan rasa yang spesifik. Warna putih tersebut disebabkan oleh adanya miselia jamur yang tumbuh pada permukaan biji kedelai. Tekstur yang kompak juga disebabkan oleh miselia-miselia jamur yang menghubungkan antara biji-biji kedelai tersebut. Terbentuknya rasa yang spesifik disebabkan karena adanya

degradasi komponen-komponen dalam kedelai yang terjadi setelah fermentasi (Dwinaningsih, 2010).

Terdapat berbagai macam jenis tempe di Indonesia yang tergantung pada jenis bahan baku yang digunakan (Suprapti, 2007).

**Tabel 2.1 Jenis Tempe di Indonesia (Suprapti, 2007)**

No.	Bahan Baku	Jenis>Nama Tempe
1	Kedelai ( <i>Glycine max</i> )	Tempe kedelai
2	Ampas tahu/kedelai	Tempe gembus
3	Bungkil kacang tanah	Tempe bungkil (Jateng)
4	Ampas kelapa	Tempe bongkrek <sup>*)</sup>
5	Bungkil kacang + ampas tahu	Tempe enjes (Malang)
6	Koro benguk ( <i>Mucuna pruriens</i> )	Tempe benguk (Yogya)
7	Biji kecipir ( <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> )	Tempe kecipir (Sumenep)
8	Lamtoro ( <i>Leucaena glauca</i> )	Tempe lamtoro (Yogya)
9	Onggok + ampas tahu + bungkil kacang	Oncom merah (Jabar)
10	Onggok + bungkil kacang	Oncom hitam (Jabar)

Keterangan: <sup>\*)</sup> Tempe bongkrek (Banyumas) mengandung racun yang dapat mematikan manusia

Setiap jenis tempe memiliki daerah pemasaran sesuai dengan selera masyarakat setempat. Jenis-jenis tempe tersebut agak sulit untuk menembus daerah lain, kecuali tempe kedelai. Tempe kedelai bisa diterima di berbagai daerah dan sangat mudah menembus pasar di seluruh pelosok Pulau Jawa dan kota-kota besar di luar Jawa. Saat ini tempe telah mampu menembus pasaran dunia, yakni Belanda, Australia, dan nega-negara asia pada umumnya (Suprapti, 2007).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Balai Besar Penelitian Industri Hasil Pertanian di Bogor menunjukkan bahwa kadar protein dalam kedelai berbeda jauh dengan kadar protein yang terkandung dalam tempe (Suprapti, 2007).

**Tabel 2.2 Perbandingan Kadar Protein dalam Kedelai dan Tempe (Suprapti, 2007)**



No.	Jenis Unsur	Kedelai	Tempe
1	Protein	35% - 40%	15%
2	Karbohidrat	2%	5%
3	Lemak	20%	5%
4	Kadar air	9,25%	62,5%
5	Berat	1.000 g	1.500g

Penurunan kadar protein dalam tempe pada tabel tersebut bukanlah dalam arti sesungguhnya, karena secara umum berat tempe menjadi lebih besar (1,5 – 2 kali) dibandingkan berat awal kedelai. Hal ini disebabkan oleh adanya peristiwa penyerapan air selama proses pengolahan berlangsung (Suprpti, 2007). Kadar nitrogen total didalam tempe sedikit bertambah, kadar abu meningkat, namun kadar lemak dan kadar nitrogen asal proteinnya berkurang (Dwinaningsih, 2010).

**Tabel 2.3 Komposisi Kimia Tempe (Dwinaningsih, 2010)**

Komposisi	Jumlah
Air	61,2 %
Protein kasar	41,5 %
Minyak kasar	22,2 %
Karbohidrat	29,6 %
Abu	4,3 %
Serat kasar	3,4 %
Nitrogen	7,5 %

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Kementerian Kesehatan) pada tahun 1991 juga melakukan penelitian terhadap kandungan gizi dalam tempe (PUSIDO Badan Standardisasi Nasional, 2012).

**Tabel 2.4 Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia (BSN, 2012)**

Zat Gizi	Satuan	Komposisi zat gizi dalam 100 gram
----------	--------	-----------------------------------



		Kedelai	Tempe
Energi	(kal)	381	201
Protein	(gram)	40,4	20,8
Lemak	(gram)	16,7	8,8
Hidrat arang	(gram)	24,9	13,5
Serat	(gram)	3,2	1,4
Abu	(gram)	5,5	1,6
Kalsium	(mg)	222	155
Fosfor	(mg)	682	326
Besi	(mg)	10	4
Karotin	(mkg)	31	34
Vitamin B1	(mg)	0,52	0,19
Air	(gram)	12,7	55,3

Isoflavon dapat ditemukan pada tempe. Kandungan komponen isoflavon yang dapat ditemukan diantaranya adalah genistein, daidzein, genistin dan daidzin (Iskandar & Priatni, 2008). Kandungan isoflavon pada tempe telah dilaporkan memiliki kadar yang berbeda-beda bergantung pada jenis tempe yang digunakan (Bhagwat, et al., 2008).

**Tabel 2.5. Kandungan isoflavon tempe dalam 100 gram bahan** (Bhagwat, et al., 2008)

Jenis Tempe	Nutrisi	Rata-rata (mg)
Tempe	Daidzein	22,66
	Genistein	36,15
	Glycitein	3,82
	Total Isoflavon	60,61
Tempe yang dimasak	Daidzein	13,12
	Genistein	21,14
	Glycitein	1,39
	Total Isoflavon	35,64
Tempe yang digoreng	Daidzein	32,90
	Genistein	39,90
	Total Isoflavon	72,80

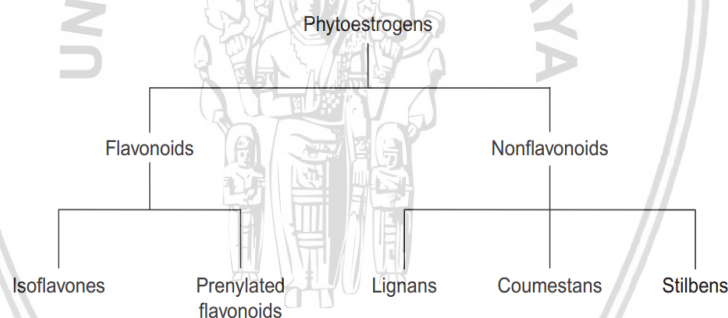
## 2.5 Fitoestrogen

### 2.5.1 Fitoestrogen dan Isoflavon

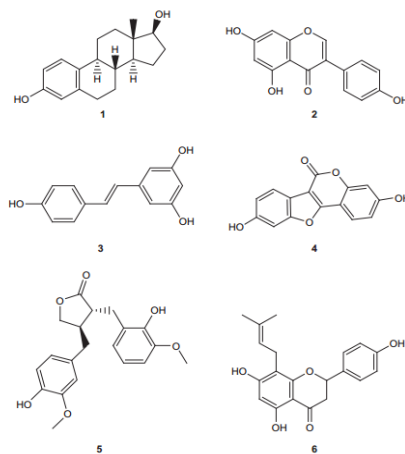
Fitoestrogen merupakan kelompok besar pengganti senyawa fenolik yang disebut flavonoid. Fitoestrogen juga dikenal sebagai estrogen yang diturunkan dari tanaman atau *dietary estrogens* akibat dari aktivitas

biologisnya sebagai *nonsteroidal phytochemicals*. Kandungan fitoestrogen cukup tinggi dalam makanan tertentu seperti produk kedelai dan produk kacang-kacangan atau biji-bijian tertentu (Cvejic', et al., 2012; Carmichael, et al., 2011).

Fitoestrogen berdasarkan struktur kimianya terbagi menjadi isoflavon, lignan, coumestans, stilbens, dan fenil flavonoid. Kelompok nonflavonoid dari fitoestrogen adalah lignan, coumestans dan stilbens. Fitoestrogen memiliki potensi kegunaan seperti hormon estrogen dan telah disamakan dengan *selective estrogen receptor modulators (SERMs)* alami karena memiliki kemiripan dengan struktur dari hormon estradiol (17- $\beta$ -estradiol) (Cvejic', et al., 2012).



**Gambar 2.8** Bagan pembagian fitoestrogen (Cvejic', et al., 2012)

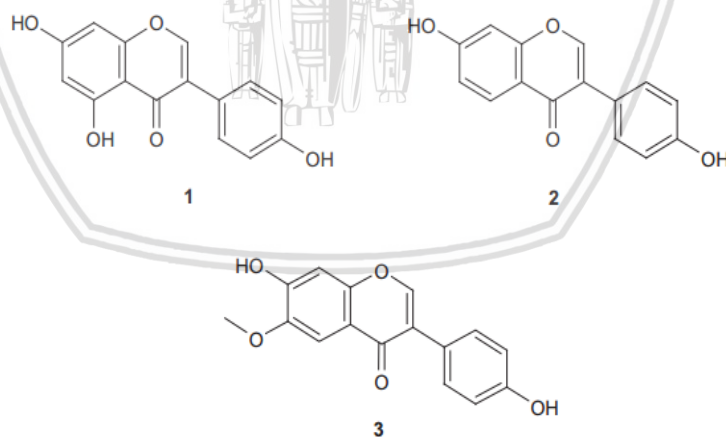


**Gambar 2.9 Kesamaan struktur antara fitoestrogen dan estradiol**  
(Cvejic', et al., 2012)

Keterangan: (1) 17β-estradiol, (2) genistein (isoflavone), (3) trans-resveratrol (stilbene), (4) coumestrol (coumestan), (5) matairesinol (lignan), and (6) 8-prenyl naringenin

Fitoestrogen sebagian besar muncul pada tanaman dan makanan sebagai glikosida (berikatan dengan separuh karbohidrat) dan sebagian kecilnya muncul sebagai aglikon (fitoestrogen yang tidak terikat). Fitoestrogen yang sering dikonsumsi manusia adalah isoflavon dan resveratrol (Cvejic', et al., 2012).

Isoflavon merupakan komponen terpenting dari fitoestrogen. Kedelai dan produk kedelai merupakan penghasil utama dari isoflavon pada makanan. Kedelai mengandung 12 jenis fitoestrogen termasuk daidzein, genistein, dan glisitein yang merupakan aglikon yang dapat membentuk tiga glukosida, yaitu β-glucoside, 6<sup>n</sup>-O-malonyl-glucoside dan 6<sup>n</sup>-O-acetyl-glycoside (Cvejic', et al., 2012).



**Gambar 2.10 Isoflavon** (Cvejic', et al., 2012)

Keterangan: Struktur ikatan isoflavon (1) Daidzein, (2) Genistein, (3) Glisitein.

Jenis fitoestrogen yang berbeda memiliki aktivitas biologis yang berbeda. Genistein di dalam kedelai adalah senyawa teraktif dalam isoflavon

(Cvejic', et al., 2012). Genistein akan menyebabkan peningkatan MOFs. Genistein merupakan inhibitor tirosin kinase selain berfungsi seperti estrogen. Mekanisme pertama adalah ketika estrogen memperoleh tindakan dari *nuclear hormone receptors*, reseptor estrogen (RE)- $\alpha$  dan RE  $\beta$  (Chen, et al., 2007).

Jumlah isoflavon didalam kedelai ditemukan sekitar 0,1-0,4% dari berat kering. Kedelai yang merupakan sumber fitoestrogen terbagi menjadi dua jenis yaitu kedelai fermentasi dan nonfermentasi. Kedelai nonfermentasi meliputi kedelai asli, kecambah kedelai, sari kedelai, tahu, tepung protein kedelai panggang, miso, natto, kecap. Tempe merupakan golongan dari kedelai fermentasi (Cvejic', et al., 2012).

Kandungan isoflavon pada produk kedelai nonfermentasi lebih besar 2-3 kali dibandingkan dengan produk kedelai fermentasi yaitu tempe, akan tetapi tempe memiliki aglikon yang lebih besar dibandingkan kedelai nonfermentasi karena adanya hidrolisis selama fermentasi (Cvejic', et al., 2012). Kadar genistein pada ekstrak tempe dilaporkan sebesar 5,52  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Kadar tersebut lebih besar 5 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak susu kedelai (Fawwaz, et al., 2017).

Jumlah serta komposisi isoflavon berkaitan dengan tahun, daerah pertumbuhan, dan lingkungan seperti genotip. Konsentrasi isoflavon pada kedelai dapat dipengaruhi oleh suhu. Kandungan isoflavon pada suhu yang tinggi ditemukan lebih rendah daripada tanaman yang ditanam pada suhu yang lebih rendah. Perbedaan suhu tersebut akan mempengaruhi konsentrasi isoflavon pada kotiledon, tetapi konsentrasi isoflavon pada hipokotil relatif konstan. Suhu yang rendah dan kelembapan tanah yang

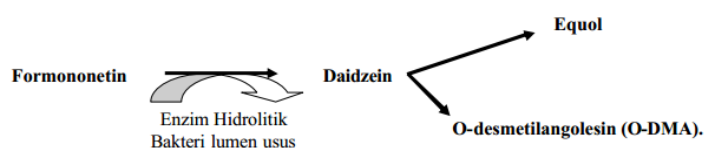
tinggi menyebabkan kandungan isoflavon yang lebih tinggi (Cvejic', et al., 2012).

## 2.5.2 Absorpsi dan Ikatan Fitoestrogen

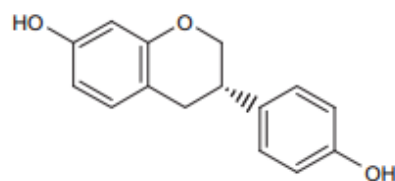
### 1. Perubahan Fitoestrogen pada Organisme

Biochanin A dan formononetin merupakan prekursor metilasi dari genistein dan daidzein. Bakteri usus akan merubah turunan malonil dan asetil menjadi glikosida dan metilasi isoflavon (biochanin A dan formononetin) menjadi bentuk demetilasi (genistein dan daidzein). Daidzein dibentuk dari formononetin oleh enzim hidrolitik bakteri usus dan dimetabolisme menjadi equol dan O-desmetilangolesin (O-DMA) (lihat gambar 2.10) sedangkan genistein dibentuk dari biochanin A dimetabolisme menjadi p-etilefenol estrogen inaktif (lihat gambar 2.11). Bentuk glikosida dari isoflavon akan dihidrolisis oleh  $\beta$ -glikosidasi menjadi bentuk aglikon pada jejunum (Suparman, 2014).

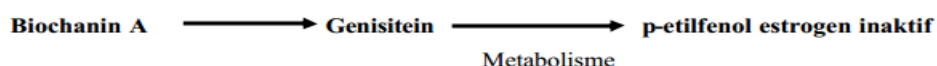
Equol dan/atau metilangelolensin akan diserap oleh usus. Kemampuan metabolisme daidzein menjadi equol tidak sama pada semua orang. Bakteri lingkungan sangat penting dalam merubah isoflavon menjadi aglikon dan equol. Tidak semua orang dapat mengabsorpsi isoflavon pada tingkatan yang sama karena adanya perbedaan flora usus besar pada masing-masing individu (Cvejic', et al., 2012).



**Gambar 2.11 Metabolisme Daidzein** (Suparman, 2014)



**Gambar 2.12 Struktur Ikatan Equol** (Cvejic', et al., 2012)



**Gambar 2.13 Metabolisme Biochanin A** (Suparman, 2014)

## 2. Aktivitas “*estrogen like*” pada fitoestrogen

Manfaat dan bahaya dari fitoestrogen bagi kesehatan masih belum terpecahkan. Hal ini memiliki jawaban yang kompleks dan dapat bergantung pada usia, status kesehatan dan ada tidaknya mikroflora usus (Patisaul & Jefferson, 2010). Aktivitas estrogenik pada isoflavon bergantung pula pada tipe aglikon. Genistein memiliki afinitas yang lebih tinggi pada reseptor estrogen dibandingkan dengan daidzein dan glistein. Isoflavon protein kedelai seringkali digunakan pada proses pembuatan makanan dan susu formula. Hal ini menunjukkan secara efektif dapat memberikan isoflavon dan mampu memberi porsi yang signifikan dari dosis total ke sirkulasi pada bentukan aktif aglikon (Cvejic', et al., 2012).

Aktivitas biologis menyerupai hormon estrogen pada fitoestrogen berasal dari kesamaan struktur dengan estrogen pada manusia, serta kemampuan mengikat secara konsekuen pada reseptor estrogen. Fitoestrogen dapat berperan sebagai agonis dan antagonis estrogen, sehingga dapat berfungsi sebagai *selective estrogen receptor modulators* (Carmichael, et al., 2011; Sharif, et al., 2011; Cvejic', et al., 2012).

## 3. Struktur fitoestrogen yang serupa dengan estrogen

Struktur kimia fitoestrogen memiliki kesamaan polaritas dan berat molekul seperti estradiol. Hal terpenting pada struktur kimia fitoestrogen adalah adanya cincin fenolik yang akan berperan dalam mengikat reseptor estrogen. Pada struktur isoflavon, cincin A dan C serupa dengan cincin A dan B pada estradiol. Jarak antara gugus hidroksil pada genistein dan estradiol juga serupa. Kelompok tersebut secara kritis terletak untuk memungkinkan mengikat protein reseptor estrogen (Cvejic', et al., 2012).

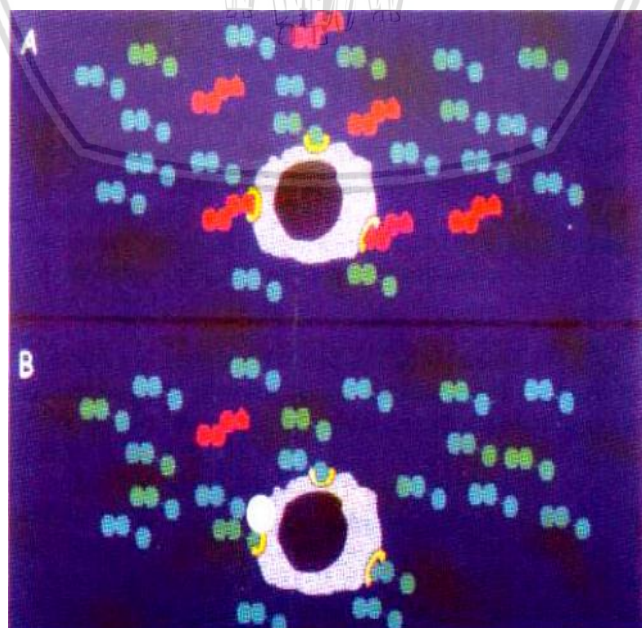
Struktur inti flavonoid dengan dua hingga empat gugus hidroksil pada posisi tertentu merupakan dasar untuk aktivitas estrogen tersebut, namun metilasi gugus hidroksil akan menyebabkan berkurangnya efek estrogenik. Isoflavon memiliki aktivitas estrogenik yang lebih besar daripada flavonoid, hal ini disebabkan karena dua gugus hidroksil yang terletak pada cincin benzil (Cvejic', et al., 2012).

Fitoestrogen memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor estrogen baik dalam mengaktifkan atau memblokir yang tergantung pada kondisi estrogen sehingga muncul efek estrogenik dan antiestrogenik. Senyawa ini lebih sering mengikat reseptor estrogen  $\beta$  yang ditemukan pada sistem saraf pusat, tulang, dinding pembuluh darah, saluran urogenital dan ovarium (Satyaningtjas, et al., 2014; Cvejic', et al., 2012). Reseptor estrogen- $\alpha$  dapat ditemukan di ovarium, payudara, uterus, testis, hipofisis, ginjal, epididimis dan adrenal (Satyaningtjas, et al., 2014). Isoflavon memiliki afinitas ke reseptor payudara dan jaringan rahim yang lebih rendah dibandingkan estrogen (Sharif, et al., 2011; Cvejic', et al., 2012).

#### 4. Mekanisme kerja Agonis dan Antagonis Fitoestrogen

Estrogen merupakan hormon yang diproduksi di dalam sel telur dan sel sperma. Dimer akan terbentuk setelah estrogen berikatan dengan reseptor estrogen yang telah di terjemahkan dalam nukleus. Dimer tersebut akan berinteraksi menanggapi unsur estrogen yang mengatur transkripsi gen estrogen-responsif. Bentuk dominan estrogen dalam tubuh adalah  $17 \beta$ -estradiol (Cvejic', et al., 2012).

Berkaitan dengan konsentrasi estradiol, fitoestrogen memberikan *selective action* pada beberapa jaringan fitoestrogen yang akan menunjukkan respons proestrogenik dan menghambat tindakan estrogenik. Ketika jumlah estrogen endogen dalam sirkulasi rendah (seperti pada wanita menopause) ikatan fitoestrogen akan berperan sebagai agonis dan meningkatkan efek estrogen. Fitoestrogen pada keadaan estrogen yang normal akan bertindak sebagai antiestrogenik. Hal ini dapat digunakan dalam mencegah kanker yang bergantung pada hormon, seperti kanker payudara (Cvejic', et al., 2012; Suparman, 2014).





### Gambar 2.14 Mekanisme kerja isoflavon memiliki sifat estrogenik dan antiestrogenik (Suparman, 2014).

Keterangan: (A) Bila kadar estrogen memadai, isoflavon (biru) bekerja sebagai antiestrogen dengan cara berkompetisi dengan dalam menduduki Reseptor Estrogen (RE) (kuning) (premenopause); (B) Bila kadar estrogen kurang, isoflavon akan mengambil alih efek estrogen (pasca menopause).

Sifat antagonis akan muncul ketika senyawa tersebut berikatan dengan reseptor namun tidak terbentuk dimer atau konfigurasi yang tepat untuk aktivasi tidak tercapai. Senyawa yang memiliki kemampuan berperan sebagai agonis dan antagonis estrogen disebut *Selective Estrogen Receptor Modulators*. Efek agonis dan antagonis ini bertanggung jawab pada perbedaan efek fitoestrogen dengan estradiol (Cvejic', et al., 2012).

Terdapat dua jenis reseptor estrogen yakni reseptor estrogen  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) dan reseptor estrogen  $\beta$  (ER  $\beta$ ) yang dapat dilokalisasi dalam sel yang sama, namun jumlahnya dalam jaringan berbeda-beda dan dapat memiliki efek yang berbeda pada campuran agonis dan antagonis (Cvejic', et al., 2012). Profil ekspresi dari ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  unik terhadap tempat utama dari ER  $\alpha$  yang ada di uterus dan kelenjar pituitari dan tempat utama dari ekspresi ER  $\beta$  berada di sel granulosa ovarium (Hamilton, dkk. 2017).

Kedua reseptor estrogen tersebut dipisahkan oleh gen dimana ER  $\alpha$  terletak pada kromosom 6 dan ER  $\beta$  pada kromosom 14 (Norman & Litwack, 2015). Distribusi ekspresi mRNA ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  pada jaringan tergambar sebagai berikut:

**Tabel 2.6. Distribusi mRNA ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  pada jaringan** (Norman & Litwack, 2015)

**TABLE 13-2 Tissue Distribution of ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA<sup>1</sup>**

Tissue	ER $\alpha$	ER $\beta$
Uterus	++++	-
Ovary	+++	++++
Pituitary	+++	-
BAT <sup>2</sup>	++	-
WAT <sup>2</sup>	++	-
Skin	++	-
Kidney	++	-
Sk. Muscle	++	-
Liver	+	-
Bone	+	-
Hypothalamus	+	+

<sup>1</sup>mRNA levels of ER $\alpha$  and ER $\beta$  were measured as arbitrary units in mouse tissues. +++, >1.0; ++, 0.5-0.99; +, 0.1-0.49; +, 0.02-0.095

<sup>2</sup>BAT = Brown adipose tissue; WAT = White adipose tissue

Data abstracted from NURSA (Nuclear Receptor Signaling Atlas): [www.nursa.org/10.1621/datasets.02001](http://www.nursa.org/10.1621/datasets.02001) (2005) Bookout A.L., Jeong, Y., Doumes, M., Yu, R., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J.

Kerja dalam tingkat molekul dan sel dipengaruhi oleh banyak faktor, termasuk ketergantungan pada konsentrasi, status reseptor, adanya estrogen endogen, dan jenis target organ atau sel. Estrogen memiliki afinitas yang tinggi dalam berikatan dengan reseptor  $\alpha$  dan isoflavon memiliki afinitas yang tinggi pada reseptor  $\beta$  (Cvejic', et al., 2012).

##### 5. Ikatan isoflavon pada reseptor estrogen

Isoflavon memiliki afinitas ikatan pada RE $\alpha$ , RE $\beta$ , reseptor progesteron (RP) dan reseptor androgen (RA). Keutamaan mengikat estrogen non steroid ke reseptor ER $\beta$  menunjukkan bahwa kerja isoflavon dapat digunakan melalui jalur yang berbeda dan terpisah dari estrogen steroid. Afinitas ikatan pada isoflavon lebih rendah daripada estrogen manusia. Isoflavon memiliki  $10^{-2}$  sampai  $10^{-3}$  kali lebih rendah efek estrogenik dibandingkan dengan estradiol atau estron (Cvejic', et al., 2012).

Isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada organ sel yang berbeda. Afinitas ikatan relatif genistein hanya 0,0125 dibandingkan dengan 1,0 untuk estradiol dan potensi estrogenik relatifnya sebanyak 0,0008 dibanding estradiol sebanyak 1,0. Genistein dan daidzein memiliki

afinitas 100 dan 1000 kali lebih rendah untuk mengikat reseptor estrogen dari estradiol (Cederroth, et al., 2008; Cvejic', et al., 2012).

## 2.6 Tikus

### 2.6.1 Pengertian Tikus

Tikus (*Rattus* sp.) merupakan jenis hewan pengerat yang merugikan dan menjadi hama di tanaman petani. Perkembangbiakan tikus sangat luar biasa. Sekali beranak, tikus dapat menghasilkan 15 ekor, dan rata-rata 9 ekor anak. Tikus yang sering digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium adalah tikus albino (tikus putih) (Akbar, 2010).

Tikus *Rattus norvegicus* digunakan sebagai hewan coba karena mempunyai kemiripan fungsi, bentuk organ dan proses biokimia serta biofisik dengan mamalia yang sama. Kemampuan reproduksi *Rattus norvegicus* tinggi karena tidak mempunyai musim kawin, masa kebuntingan yang singkat, sehat, bersih dan cocok untuk berbagai jenis penelitian (Sirois, 2005).

Hewan ini tergolong tenang dan mudah ditangani di laboratorium dan tidak bisa muntah karena struktur anatominya tidak lazim di esofagus yang bermuara ke dalam lambung dan tidak memiliki kantung empedu (Sirois, 2005).

### 2.6.2 Klasifikasi Tikus

Menurut Adam (2010), klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Odontoceti  
Familia : Muridae  
Genus : Rattus  
Spesies : Rattus Norvegicus



**Gambar 2.15 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)** (Akbar, 2010)

Tikus putih memiliki lama hidup yang berkisar antara 4-5 tahun (Sirois, 2005). Konsumsi pakan perhari sebanyak 5 gram per 100 grBB dan air minum perhari sebanyak 8-11 ml per 100 grBB. Lama siklus estrus berkisar selama 5 hari dan tergolong poliestrus (Kusumawati, 2004).

### **2.6.3 Reproduksi Tikus**

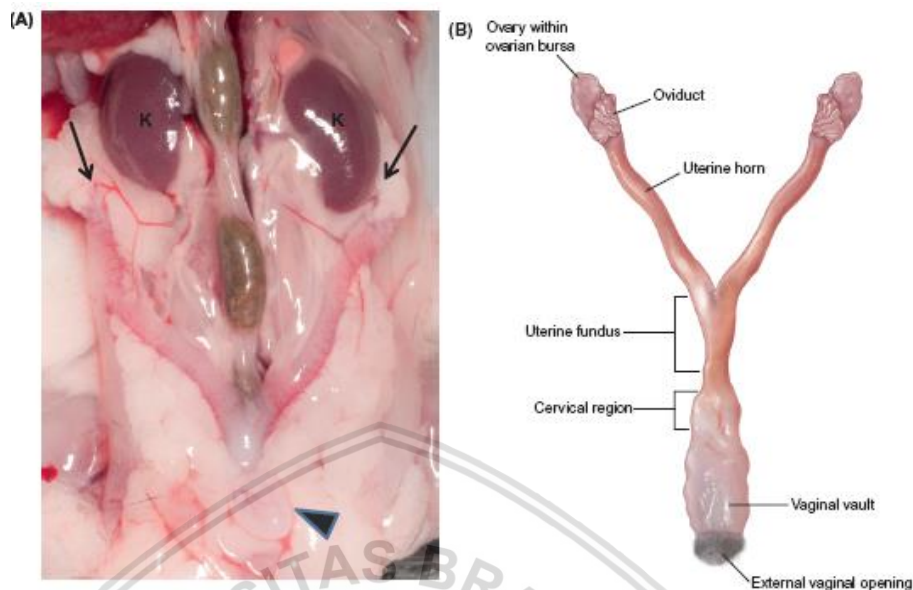
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina merupakan mamalia yang tergolong ovulator spontan. Pada golongan ini ovulasi terjadi pada pertengahan siklus estrus yang ditandai dengan lonjakan LH (*Luteinizing Hormone*). Tikus termasuk hewan poliestrus, memiliki siklus reproduksi yang sangat pendek. Setiap siklus berkisar 4-5 hari. Ovulasi berlangsung 8-11 jam sesudah dimulainya fase estrus. Folikel yang sudah kehilangan ovum akibat dari ovulasi akan berubah mejadi korpus luteum yang akan menghasilkan progesteron dari rangsangan LH yang berfungsi untuk menyiapkan endometrium agar reseptif terhadap implantasi (Akbar, 2010).

### 2.6.3.1 Sistem Reproduksi Ovarium

Bentuk ovarium sangat bervariasi sesuai dengan spesies dan tergantung pada hewannya yaitu golongan politokus atau monotokus (hewan yang melahirkan lebih dari satu). Ovarium adalah kelenjar berbentuk biji yang terletak disebelah kanan dan kiri uterus dibawah tuba uterin dan terikat di belakang oleh mesovarium. Ovarium merupakan penghasil telur dan juga hormon estrogen dan progesteron.

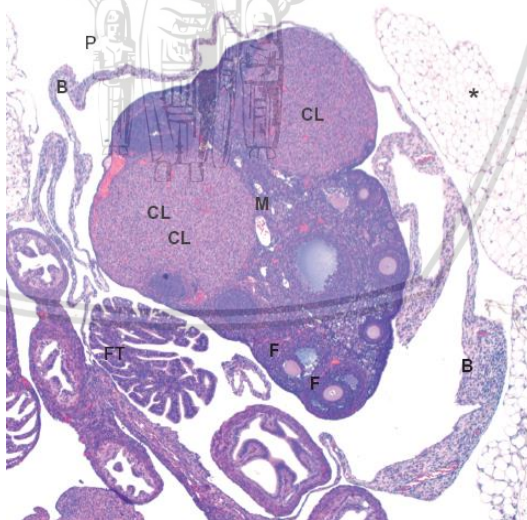
Ovarium didalamnya terdapat perkembangan folikel telur, yaitu folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff, korpus rubrum, korpus luteum dan korpus albikan. Folikel telur adalah sel telur yang dikelilingi oleh sel folikel (sel granulosa) dengan ketebalan lapisan yang bervariasi tergantung dengan tingkat perkembangannya (Akbar, 2010).

Ovarium tikus merupakan struktur yang terdiri dari sepasang bulatan. Ovarium tersebut terletak pada sisi kaudal dari ginjal, melekat ke dinding tubuh bagian dorsal dari mesovarium dan tertutupi oleh bursa elastis transparan. Ruang periovarian tertutup ke rongga perut oleh bursa ovarium, kecuali saluran kecil di bursa dimana tempat pembuluh darah dan saraf yang masuk dan meninggalkan hilus ovarium (Rendi, et al., 2012).



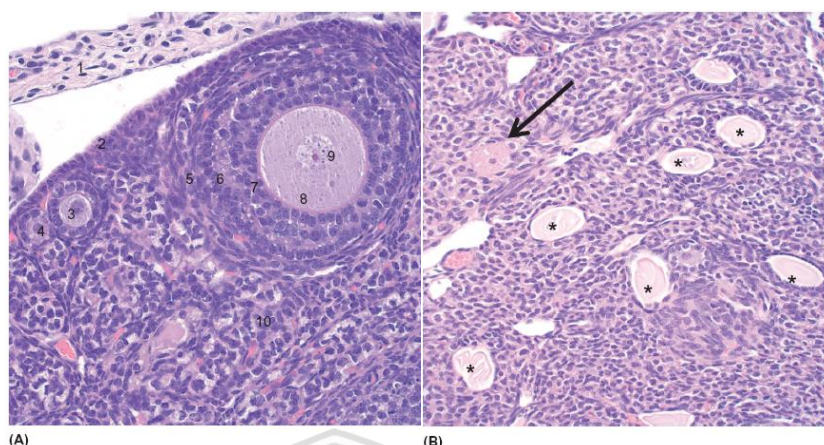
**Gambar 2.16 Anatomi regional tikus** (Rendi, et al., 2012)

Keterangan: (A) Saluran reproduksi tikus *in situ*. Sepasang ovarium (tanda panah) terletak pada kaudal ginjal (K) terletak di dalam bantalan lemak ovarium. Pasangan tanduk uterus bertemu di fundus. Kandung kemih (mata panah) terlihat pada permukaan ventral dari liang vagina. (B) *Ex vivo* saluran reproduksi tikus menunjukkan sepasang ovarium dan tuba falopi, *duplex* uterus, liang vagina, dan lubang luar vagina.



**Gambar 2.17 Ovarium tikus** (Rendi, et al., 2012)

Keterangan: Ovarium tikus terletak didalam lemak (*asterisk*) pada sisi kaudal ginjal dan dikelilingi oleh bursa ovarium (B). Siklus estrus biasanya terjadi 4-6 hari, dan multiple folikel (F) matang akan terstimulasi. Pada tikus, pemeliharaan kehamilan bergantung pada progesterone yang dihasilkan oleh korpus luteum (CL). Ovarium memiliki dua daerah yang kurang terdefinisi yakni daerah vascular tinggi yaitu medulla (M) dan sisi luar yaitu korteks yang berisi folikel yang berkembang dan korpus luteum.



**Gambar 2.18 Gambaran Ovarium Tikus (Rendi, et al., 2012)**

Keterangan: (A) Permukaan ovarium dilapisi oleh lapisan sel kuboid yaitu epitel germinativum (1); Folikel primordial (4) ditemukan dibawah epitel germinativum pada tunica albuginea. Folikel polyovular tidak umum ditemukan pada tikus muda. Saat ovulasi epitel germinativum akan ruptur dan ovum akan dilepaskan ke rongga periovarian. (1) ovarian bursa; (2) epitel germinativum; (3) folikel primer unilaminar; (4) folikel primordial; (5) sel teka; (6) sel luteal; (7) sel granulosa dan kumulus oophorus; (8) zona pelusida; (9) oosit; (10) stroma ovarium. (B) Folikel atresia (*asterisks*) dan akumulasi sel dengan pigmen sitoplasma berwarna coklat terang (tanda panah) ditemui pada tikus yang lebih tua.

Siklus ovariumnya didalam setiap spesies memiliki ciri sendiri terhadap rata-rata jumlah ovum yang diovulasikan. Hal ini disebabkan oleh faktor-faktor genetik, musim, nutrisi, dan faktor lingkungan lain. Pada manusia dan beberapa spesies terjadi ovulasi tunggal, maka hanya ada satu folikel yang diovulasikan. Sedangkan pada primata tingkat tinggi, seleksi folikel dimulai sejak beberapa hari pertama dalam siklus menstruasi. Folikel yang terseleksi akan dominan, tumbuh dan berkembang dengan cepat. Sedangkan folikel lainnya akan mengalami atresia (Karlina, 2003).

### 2.6.3.2 Siklus Reproduksi

Siklus reproduksi pada beberapa mamalia disebut dengan siklus estrus yang merupakan periode secara psikologis dan fisiologis siap menerima pejantan untuk bersenggama. Periode dari permulaan

periode birahi ke periode birahi selanjutnya disebut siklus estrus. Siklus estrus adalah siklus pada mamalia bukan primata yang tidak mengalami menstruasi. Siklus estrus merupakan gambaran dari berbagai aktivitas dari hipotalamus, hipofisis, dan ovarium. Selama siklus estrus berlangsung terjadi perubahan baik pada organ reproduksi maupun tingkah laku seksual (Akbar, 2010).

Siklus estrus terbagi berdasarkan banyak sedikitnya fase dalam siklus estrus tersebut dalam satu tahun. Hewan yang hanya memiliki satu siklus estrus disebut monoestrus, sedangkan bila hewan tersebut memiliki lebih dari satu siklus estrusnya disebut poliestrus (Austin & Short, 1984; Karlina, 2003). Tikus merupakan hewan poliestrus yang artinya dalam periode satu tahun terjadi siklus reproduksi yang berulang ulang (Akbar, 2010) meskipun dalam tikus sendiri mengalami fase menyusui dimana seolah-olah fase reproduksinya berhenti dan disebut *lactional diestrus* (Karlina, 2003). Daur estrus dibedakan menjadi lima fase yaitu Proestrus, Estrus, Metestrus dan Diestrus. Siklus estrus mencit berlangsung 4-5 hari dimana pada masing-masing siklus berlangsung selama 1 hari. Sedangkan satu siklus dapat selesai dalam waktu 6 hari dengan perpanjangan waktu pada fase diestrus dan proestrus (Otto, et al., 2015; Akbar, 2010).

Pemilihan waktu siklus dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor eksteroseptif seperti suhu, cahaya, hubungan sosial, dan status nutrisi (Akbar, 2010). Ovulasi biasa terjadi pada 8-11 jam dari onset fase estrus, biasanya pada tengah malam dan jam 2 pagi (Otto, et al., 2015). Menurut Partodihardjo (1980), Austin dan Short (1984), dan



Akbar (2010) pada setiap fase dari siklus reproduksi tikus dapat dikenali dengan pemeriksaan apus vagina. Apus vagina merupakan cara dianggap relatif mudah dan murah sampai saat ini untuk mempelajari kegiatan fungsional ovarium. Melalui apus vagina dapat dipelajari berbagai tingkat perbedaan sel epitel vagina yang mencerminkan perubahan fungsional ovarium. Siklus reproduksi tikus secara kasar dapat terbagi menjadi empat siklus/fase yaitu:

#### 1. Fase proestrus

Proestrus merupakan fase sebelum estrus yaitu periode dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel de Graff dibawah pengaruh hormon FSH. Fase ini berlangsung selama 12 jam. Setiap folikel akan mengalami pertumbuhan yang cepat selama 2-3 hari sebelum estrus sistem reproduksi memulai persiapan-persiapan untuk pelepasan sel telur dari ovarium. Sehingga estrogen dalam darah akan meningkat dan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan saraf, serta kelakuan birahi pada hewan-hewan betina peliharaan. Perubahan fisiologis meliputi pertumbuhan folikel, meningkatnya vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina pada beberapa spesies serta meningkatnya pertumbuhan endometrium, uterus dan serviks. Preparat apus vagina pada fase ini ditandai dengan tampak jumlah sel epitel berinti dan sel darah putih berkurang, digantikan oleh sel epitel bertanduk, dan terdapat banyak lendir (Akbar, 2010).

#### 2. Fase Estrus

Estrus adalah fase penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk berkopulasi, fase ini berlangsung selama 12 jam. Folikel de Graff

akan membesar dan menjadi matang serta ovum akan mengalami perubahan kearah pematangan. Fase ini ditandai dengan peningkatan estrogen sehingga aktivitas hewan menjadi tinggi, telinganya selalu bergerak-gerak dan punggung lordosis. Ovulasi dapat ditemui hanya pada fase ini dan terjadi menjelang akhir siklus. Pada preparat apus vagina ditandai dengan hilangnya leukosit dan epitel berinti, hanya ada epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan berukuran besar (Akbar, 2010).

### 3. Fase Metestrus

Metestrus adalah periode setelah estrus dimana korpus luteum bertumbuh cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan adenohipofisa. Metestrus sebagian besar berada dibawah pengaruh progesteron yang dihasilkan korpus luteum. Progesteron akan menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisa sehingga menghambat pembentukan folikel de Graff yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Uterus akan mengadakan persiapan untuk menerima dan memberi makan pada embrio selama fase metestrus. Menjelang pertengahan sampai akhir metestrus, uterus menjadi lunak karena pengendoran otot uterus. Fase ini berlangsung 21 jam. Pada apus vagina ditemukan epitel berinti dan leukosit terlihat lagi dan jumlah epitel menanduk makin sedikit (Akbar, 2010).

### 4. Fase Diestrus

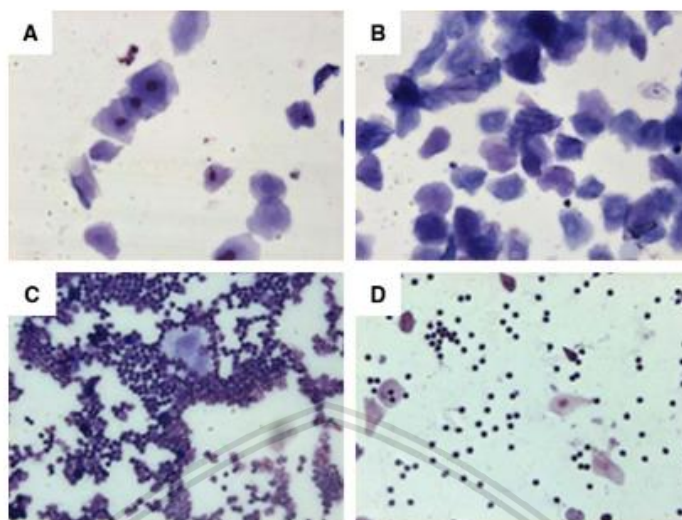
Diestrus adalah periode terakhir dan terlama siklus birahi. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum menjadi matang dan progesteron akan berpengaruh terhadap saluran reproduksi.

Endometrium akan menebal dan kelenjar-kelenjarnya mengalami hipertrofi. Serviks menutup dan lendir vagina akan lengket dan kabur. Selaput mukosa vagina akan menjadi pucat dan otot uterus mengendor. Pada akhir fase ini, korpus luteum mengalami perubahan retrogesif dan vakualisasi secara gradual. Endometrium dan kelenjar-kelenjarnya beregresi ke ukuran semula. Mulai terjadi perkembangan folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke siklus proestrus. Pada preparat apus vagina akan ditemui banyak sel darah putih dan epitel berinti yang tersebar dan homogen (Akbar, 2010).

**Tabel 2.7 Perubahan pada epitel vagina selama siklus estrus (Akbar, 2010)**

Fase siklus estrus	Lama fase (jam)	Gambaran ulas vagina dari berbagai sumber			
		Dalal et al. (2001)	Smith & Mangkoewidjojo (1988)	Nalbandov (1999)	Syahrur, et. al. (1994)
Proestrus	12	Sel epitel, leukosit sangat sedikit	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti	Sel epitel berinti, leukosit sedikit
Estrus	12	Sel tanduk makin banyak	Sel epitel mengalami penandukan	Sel berkornifikasi	Sel epitel bertanduk banyak
Metestrus	12	Sel tanduk, leukosit lebih banyak	Sel epitel berkornifikasi, terdapat leukosit	Sel berkornifikasi diantara leukosit	Sel epitel bertanduk, leukosit lebih banyak
Diestrus	65	Leukosit dan sel epitel berinti	Leukosit dan sel epitel	Sel epitel berinti dan leukosit	Sel epitel berinti dan leukosit





**Gambar 2.19** Identifikasi fase siklus estrus (Meziane, et al., 2007)

Keterangan: Gambaran ulasan vagina fase estrus tikus (A) Proestrus (B) Estrus (C) Metestrus (D) Diestrus.

#### 2.6.4 Pengaturan Hormonal pada Siklus Estrus

GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) merupakan hormon yang disintesis di hipotalamus dan disekresikan oleh hipofisis anterior melalui vena porta hipotalamus-hipofisis. Hipofisis anterior tidak memiliki serabut saraf. Pelepasan hormon dirangsang oleh faktor hormonal melalui pembuluh darah. GnRH akan mempengaruhi sekresi FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) dari hipofisis anterior. FSH dan LH akan merangsang ovarium untuk mensekresikan hormon estrogen dan progesterone sehingga akan mempengaruhi siklus estrus (Akbar, 2010).

Fase proestrus ditandai dengan folikel-folikel ovarium yang ukurannya kecil. Adanya FSH yang disintesis oleh hipofisis anterior menyebabkan sel granulosa dalam folikel akan menjadi banyak. Kemudian akan terbentuk ruangan dalam folikel. Folikel ini disebut

folikel de graff. Sel granulosa yang terdapat pada folikel de graff akan menghasilkan hormon estrogen (Akbar, 2010).

Estrogen berperan untuk merangsang pertumbuhan epitel vagina dan folikel ovarium menjadi matang dan siap ovulasi. Folikel yang matang akan terus memproduksi estrogen dan menyebabkan estrogen dalam darah tinggi. Tingginya estrogen dalam darah menandakan bahwa mencit sedang dalam fase estrus dan estrogen akan merangsang GnRH untuk memproduksi LH (Akbar, 2010).

Tahapan berikutnya akan terjadi lonjakan LH akibat dihasilkannya LH secara terus menerus. Lonjakan LH ini penting untuk terjadinya ovulasi setelah oosit II ke luar, maka folikel akan berubah menjadi korpus luteum yang memproduksi hormon progesteron. Progesteron menyebabkan perubahan-perubahan endometrium berupa perubahan lapisan endometrium yang dipersiapkan untuk terjadinya implantasi. Fase pembentukan ini terjadi pada fase metestrus (Akbar, 2010).

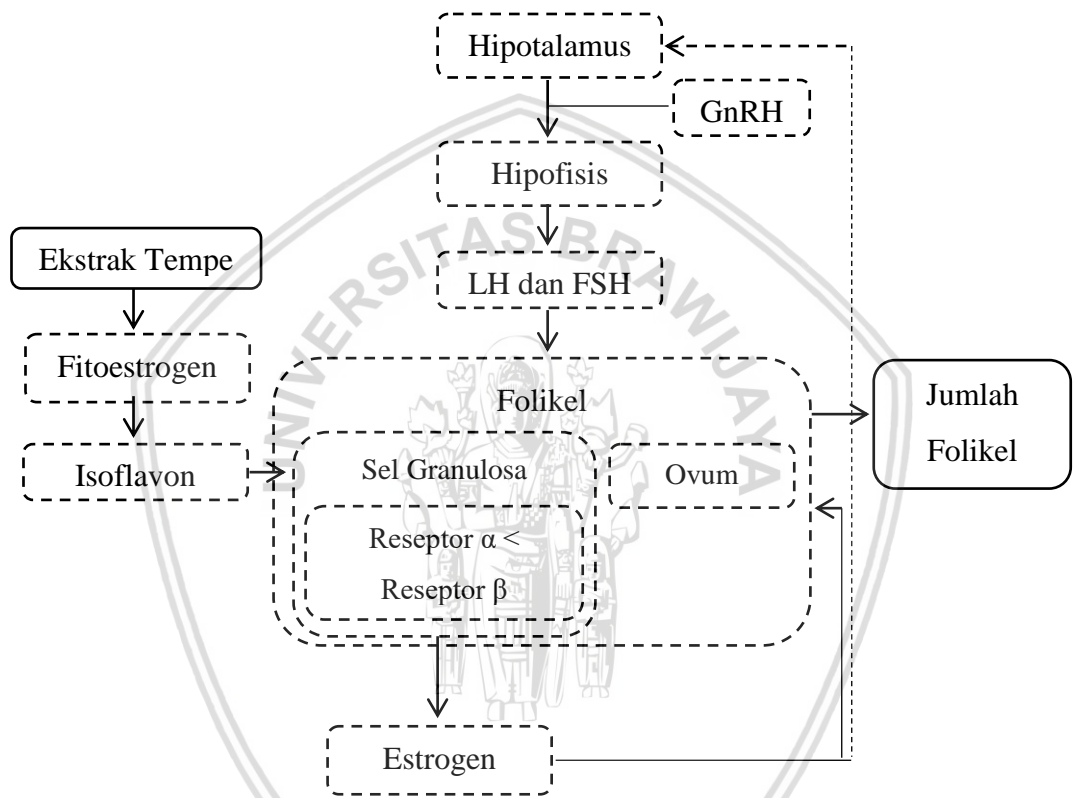
Peningkatan kadar progesteron penting untuk pertumbuhan plasenta jika terjadi implantasi pada fase diestrus. Plasenta dapat membentuk gonadotropin yang pada manusia disebut hCG (*Human Chorionic Gonadotropin*) untuk mempertahankan korpus luteum. Korpus luteum akan mampu memproduksi estrogen dan progesteron sendiri. Namun bila implantasi tidak terjadi, maka tidak akan terbentuk plasenta sehingga kadar hormon estrogen dan progesteron akan menurun. Menurunnya kadar progesteron menyebabkan meluruhnya lapisan endometrium (Akbar, 2010).



### BAB 3

## KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

- : Diteliti
- : Tidak diteliti
- > : Mempengaruhi

### 3.2 Keterangan Kerangka Konsep

Hipotalamus berperan dalam merangsang kelenjar hipofisis untuk mensekresikan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) dan akan memicu sintesis dan pelepasan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) dari hipofisis anterior. FSH berperan dalam pematangan folikel selama fase folikuler dan akan membantu LH dalam memacu sekresi hormon estrogen oleh sel granulosa dari folikel matang. Siklus ovarium dipertahankan oleh adanya mekanisme umpan balik yang bekerja antara ovarium, hipotalamus dan hipofisis (Sofoewan, 2014).

Pemberian ekstrak tempe yang mengandung fitoestrogen yakni isoflavon akan terserap oleh vili usus. Fitoestrogen tersebut akan memasuki sel granulosa ovarium melalui darah. Fitoestrogen yang memiliki struktur kimia seperti estrogen memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Senyawa ini pada ovarium akan lebih mudah mengikat reseptor estrogen  $\beta$  (RE- $\beta$ ) dibandingkan pada reseptor estrogen  $\alpha$  (RE- $\alpha$ ) (Cvejic', et al., 2012).

Fitoestrogen memiliki sifat paradoxal yaitu memiliki efek estrogenik dan antiestrogenik. Efek agonis dan antagonis ini bertanggung jawab pada perbedaan efek fitoestrogen dengan estradiol. Fitoestrogen pada keadaan estrogen normal akan bersifat antagonis terhadap estrogen (Suparman, 2014). Akibat dari efek antagonis dari fitoestrogen menyebabkan menurunnya proses dari perkembangan dan pematangan folikel sehingga jumlah folikel yang ditemukan akan menurun (Mastuti & Ciptono, 2017).

### 3.3 Hipotesa Penelitian

Pemberian ekstrak tempe dapat menurunkan jumlah folikel ovarium pada tikus putih (*rattus norvegicus*) betina strain wistar.



## BAB 4

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Rancangan penelitian ini membandingkan hasil yang telah didapatkan sesudah perlakuan (*post test*) dengan kontrol. Kelompok kontrol digunakan sebagai acuan batas nilai normal dari masing-masing variabel.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* strain wistar betina. Tikus tersebut akan diberikan perlakuan pemberian ekstrak tempe dalam beberapa dosis mulai dari usia 4-8 minggu. Pengaruh dari pemberian tersebut yaitu terhadap jumlah folikel ovarium akan diamati peneliti hanya saat setelah penelitian.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan jumlah kelompok penelitian. Perhitungan besarnya jumlah sampel penelitian menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$(n - 1) (t - 1) \geq 15$$

Keterangan:

n = jumlah sampel dalam tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

diketahui t = 4, maka didapatkan:

$$(n - 1) (4 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) (3) \geq 15$$

$$n - 1 \geq 5$$

$$n \geq 5 + 1$$

$$n \geq 6$$

Jadi, berdasarkan hasil perhitungan didapatkan  $n \geq 6$ , sehingga diperlukan minimal 6 kali pengulangan dalam setiap kelompok perlakuan. Oleh karena ada 4 kelompok perlakuan maka minimal jumlah sampel secara keseluruhan yang digunakan adalah 24 ekor tikus betina. Penelitian ini menambahkan 1 cadangan tikus pada masing kelompok sehingga jumlah tikus yang digunakan sebanyak 28 ekor.

#### 1. Kriteria Inklusi

- a. Tikus betina yang belum pernah hamil,
- b. Umur 4 minggu,
- c. Tikus sehat (aktif bergerak, tidak cacat, dan tidak ditemukan luka ditubuh).

#### 2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus sakit (karena infeksi dan diare),
- b. Tikus yang digunakan pada penelitian sebelumnya.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas: Ekstrak tempe yang diberikan dalam berbagai dosis.

Variabel tergantung: Jumlah folikel ovarium tikus betina.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus 2017 sampai Januari 2018.

## 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

### 4.5.1 Bahan Penelitian

#### 4.5.1.1 Pembuatan Ekstrak Tempe

Bahan yang digunakan adalah 3 kilogram tempe yang diperoleh dari sentra pembuatan tempe Sanan di Malang, Jawa Timur dan Etanol 70%.

#### 4.5.1.2 Pemeriksaan jumlah ovarium menggunakan *Hematoxylin*

##### *Eosin*

Bahan yang digunakan adalah Ovarium tikus sebelah kiri dan kanan; Formalin 10%; Etanol 50%, 70%, 80%, 95%; Etanol Absolute; Xilene; Kaset; Paraffin; Water bath suhu 40°; Hematoxylin (Leica) Eosin (Merck) dan Tap water.

### 4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian

#### 4.5.2.1 Pemeliharaan Hewan Coba

Pemeliharaan hewan coba dibutuhkan tempat minum di masing masing kandang dengan kandang berupa box plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 20 cm, yang ditutup menggunakan kawat berjaring dengan jumlah kandang sebanyak 4 buah, masing-masing kelompok diletakkan dalam satu kandang.

#### 4.5.2.2 Alat Menimbang Tikus

Alat yang digunakan untuk menimbang tikus adalah timbangan atau neraca digital dan log book.

#### 4.5.2.3 Pembuatan Ekstrak Tempe

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak tempe adalah timbangan, pengaduk, blender, oven, labu evaporasi 1L dan evaporator.

#### 4.5.2.4 Pemeriksaan jumlah folikel ovarium menggunakan

##### Hematoxylin Eosin

Alat yang digunakan untuk pemeriksaan jumlah folikel ovarium menggunakan Hematoxylin Eosin adalah mikrotom, *object glass*, *deckglass*, mikroskop.

#### 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Satuan	Skala	Instrumen
Ekstrak Tempe	Ekstrak tempe adalah tempe kedelai yang telah melalui proses ekstraksi menggunakan ethanol 70%. Tempe kedelai diperoleh dari Sanan, Malang, Jawa Timur yang diambil dari bongkahan yang sama dengan jenis kedelai impor dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB.	gr/200grBB/hari	Rasio	Timbangan
Jumlah Folikel Ovarium	Ovarium diwarnai menggunakan Hematoxylin Eosin (HE). Jumlah folikel yang diukur adalah folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff dan folikel atresia	buah	Rasio	Mikroskop pembesaran 400x

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini melalui beberapa tahapan kerja yang meliputi:

#### 4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba semua diadaptasi dahulu selama 1 minggu pada ruangan dengan suhu kamar ( $\pm 22-25^{\circ}\text{C}$ ), bersiklus gelap terang  $\pm 12$  jam sebelum perlakuan dimulai dengan tujuan penyesuaian lingkungan yaitu perubahan kandang dan waktu makan. Tikus diadaptasikan dengan kondisi lingkungan penelitian yang baru dan diberikan pakan standar (Laboratorium Farmakologi FK Universitas Brawijaya) serta minum air secara *ad libitum*. Setelah beradaptasi, tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Satu kelompok sebagai kelompok kontrol dan 3 kelompok sebagai kelompok perlakuan.

Pakan standar Laboratorium Farmakologi FK Universitas Brawijaya berasal dari campuran produk pakan ternak dengan tepung terigu dengan perbandingan 3:1.

#### 4.7.2 Pembagian Kelompok Sampel

Penelitian ini menggunakan 4 kelompok, masing-masing kelompok akan memiliki ulangan sebanyak 6 kali. Dosis pada kelompok perlakuan mengadaptasi dari penelitian Prabowo (2013) dengan pembagian sebagai berikut:

- a. Kelompok kontrol : diberikan pakan standar dan tanpa diberikan ekstrak tempe.
- b. Perlakuan I : diberikan pakan standar dan diberikan ekstrak tempe dengan dosis 7,5 mg/200grBB/hari.
- c. Perlakuan II : diberikan pakan standar dan diberikan ekstrak tempe dengan dosis 15 mg/200grBB/hari.

- d. Perlakuan III : diberikan pakan standar dan diberikan ekstrak tempe dengan dosis 30 mg/200grBB/hari.

#### **4.7.3 Pembuatan Ekstrak Tempe**

Tempe yang digunakan adalah tempe kedelai yang sudah difermentasi menggunakan ragi. Tempe sebanyak 5 kilogram diproses pengeringan yaitu dipotong kecil dan dimasukkan ke oven dengan suhu 40° – 60°C. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yaitu bahan kering dihaluskan dengan blender, ditimbang dan direndam pelarut 900 ml (/100 gram bahan) kemudian sebanyak 3x dikocok selama 30 menit dan direndam 1 malam sampai mengendap, selanjutnya diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif. Selanjutnya dilakukan proses evaporasi, campuran dimasukkan ke Labu Evaporasi 1 L dan dipasang pada evaporator, water bath diisi sampai penuh dan suhunya diatur sesuai titik didih pelarut. Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik. Pelarut dibiarkan terpisah dengan zat aktif, aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm$  1,5-2 jam). Hasil ekstraksi dalam bentuk pasta didapatkan sekitar 1/5 dari bahan alam kering.

#### **4.7.4 Pengenceran Ekstrak Tempe**

Ekstrak tempe diencerkan menggunakan larutan aquades sebanyak 1 cc/hari/tikus.

#### **4.7.5 Penentuan Fase**

Tikus tidak dilakukan sinkronisasi siklus. Penentuan fase dilakukan sejak 21 hari perlakuan hingga waktu pembedahan tikus dengan

mempersiapkan *cotton buds*, *object glass*, *giemsa*, alkohol dan mikroskop yang akan digunakan untuk *vaginal swab*. *Cotton buds* dimasukkan ke dalam lubang vagina untuk mendapatkan lendir tersebut ke objek *glass*, kemudian di fiksasi menggunakan alkohol dan diberi *giemsa*. *Vaginal swab* diperiksa dengan mikroskop untuk penentuan fase.

#### 4.7.6 Pemberian Perlakuan

Ekstrak tempe yang telah dilarutkan dengan aquadest diberikan melalui per oral dengan sonde, lama pemberian ekstrak tempe pada kelompok perlakuan mengacu pada penelitian Wardiana (2016) tentang pemberian fitoestrogen yang terdapat pada semanggi merah terhadap jumlah folikel ovarium tikus betina selama 28 hari di luar pemberian pakan standar.

#### 4.7.7 Pengumpulan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah 28 hari masa perlakuan pada fase estrus dengan langkah sebagai berikut:

1. Melakukan pemeriksaan fase estrus pada tikus dengan vaginal swab,
2. Saat tikus belum berada dalam fase estrus maka pembedahan akan ditunda hingga tikus tersebut berada dalam fase estrus,
3. Saat tikus sudah berada dalam fase estrus maka tikus akan segera dikorbankan,
4. Hewan coba dikorbankan menggunakan cervical dislocation,
5. Dilakukan pembedahan secara vertikal dari daerah abdomen posterior menuju anterior dengan membuka rongga perut dan rongga dada,

6. Ovarium kanan dan kiri dipisahkan,
7. Hasil yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam larutan formalin dan diberi label per masing-masing organ.

#### 4.7.8 Penentuan Jumlah Folikel

##### 4.7.8.1 Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

Pembuatan preparat histologi ovarium sesuai dengan standart Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

- 1) Proses pemotongan jaringan makros
  - a) Gross (ovarium kiri dan kanan) hasil dari bedah dibersihkan dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS). Jaringan harus sudah terfiksasi dengan formalin 10% selama 7 jam sebelum dilakukan pengerjaan selanjutnya.
  - b) Ovarium dipotong melintang dengan ketebalan  $\pm$  2-3 mm dan dimasukkan ke *kaset* dan diberikan kode yang sesuai dengan kode gross peneliti.
  - c) Jaringan kemudian diproses dengan alat *Tissue Tex Prosesor*.
  - d) Diproses menggunakan alat *Tissue Tex Prosesor* selama 90 menit.
  - e) Alarm bunyi tanda selesai.
- 2) Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
  - a) Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*.
  - b) Jaringan diblok dengan paraffin sesuai dengan kode jaringan.



- c) Jaringan dipotong menggunakan alat *microtome* dengan ketebalam 3-5 mikron.

### 3) Proses deparafinasi

Setelah disayat dengan ketebalan 3-5 mikron, preparat diletakkan kedalam oven selama 30 menit dengan suhu 70°-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung xylol, masing-masing 20 menit. Kemudian dimasukkan ke 4 tabung alkohol dengan durasi 3 menit setiap tabung (hidrasi), dan kemudian diberikan air mengalir selama 15 menit.

### 4) Proses pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

- a) Potongan jaringan dimasukkan ke cat utama *Harris Hematosiklin* selama 10-15 menit.
- b) Cuci dengan air mengalir 15 menit.
- c) Alkohol asam 1% 2-5x celup.
- d) Amonia lithium karbonat 3-5x celup.
- e) Cat pembeding: Eosin 1% selama 10-15 menit.

### 5) Proses dehidrasi dengan alkohol bertingkat

- a) Alkohol 70% selama 3 menit.
- b) Alkohol 80% selama 3 menit.
- c) Alkohol 96% selama 3 menit.
- d) Alkohol absolut selama 3 menit.

### 6) Proses penjernihan (*Clearing*)

- a) Xylol selama 15 menit sebanyak 2 kali

### 7) Mounting dengan entelan dan *deckglass*

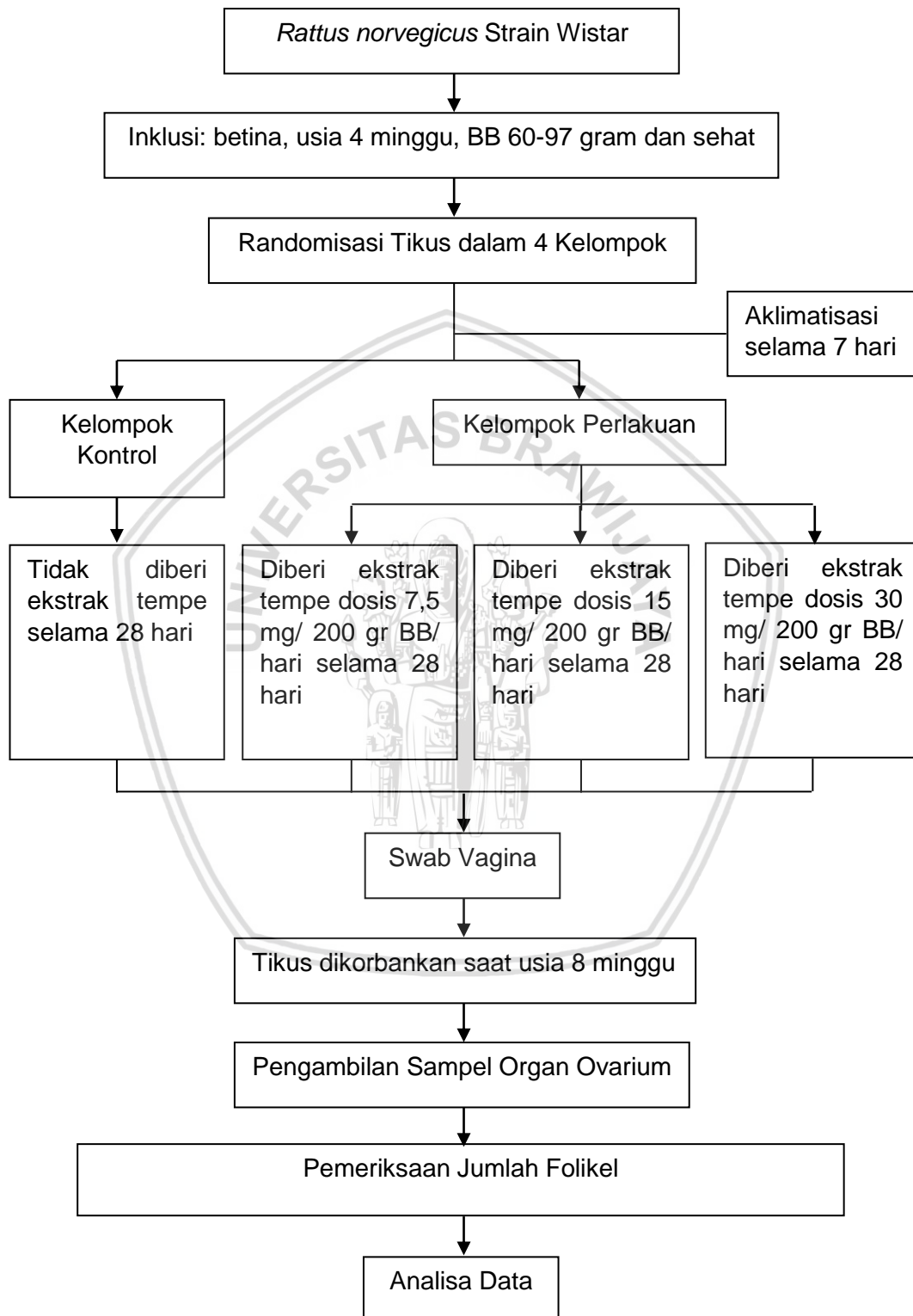
- a) Slide atau *objekglass* ditutup *cover glass* dan dibiarkan kering pada suhu ruang.
- b) Setelah kering, slide siap untuk diamati dengan mikroskop.

#### 4.7.8.2 Pengamatan Preparat Ovarium

Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop pada seluruh lapang pandang untuk menghitung seluruh jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia pada sediaan ovarium dengan pembesaran 400x.



#### 4.8 Alur Penelitian



**Gambar 4.1 Alur Penelitian**

#### 4.9 Analisis Data

Data dianalisis secara statistik menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ( $p < 0,05$ ). Langkah-langkah uji data adalah sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data bertujuan untuk mengetahui apakah data memiliki sebaran/distribusi yang normal atau tidak. Normal atau tidaknya distribusi data akan menentukan pemilihan penyajian data dan uji hipotesis. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal akan digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Apabila distribusi/sebaran data normal, maka uji hipotesis menggunakan uji parametrik, sedangkan jika sebaran data yang tidak normal, maka uji hipotesis menggunakan uji non-parametrik. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini adalah uji Shapiro-Wilk dengan cara membandingkan distribusi kumulatif dari distribusi data empirik dengan distribusi normal yang diharapkan. Dikatakan data ini memiliki persebaran yang normal bila nilai  $p > 0,05$ .
- b. Uji *Kruskal Wallis* bertujuan membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda dianggap signifikan dengan data non parametrik. Perbedaan pada kedua kelompok dianggap signifikan bila  $p < 0,05$ .

- c. *Mann Whitney test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji *Kruskal Wallis* dengan tingkat signifikansi 95% ( $p < 0,05$ ).
- d. Uji Korelasi *Spearman*: untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala non parametrik. Pada uji korelasi Pearson, bila didapatkan:
1. Sig. ( $p$ )  $> 0,05$ : tidak ada korelasi antara dua variabel.  
Sig. ( $p$ )  $< 0,05$ : ada korelasi antara dua variabel
  2. Kekuatan korelasi  $> 0,5$ : korelasi yang cukup kuat.  
Kekuatan korelasi  $< 0,5$ : korelasi yang lemah.
  3. Arah korelasi positif (+): searah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya.  
Arah korelasi negatif (-): berlawanan arah. Semakin besar nilai suatu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan September sampai dengan Oktober 2017. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni dengan rancangan penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design* dengan menggunakan hewan coba tikus betina *rattus norvegicus* strain wistar usia 4 minggu sebanyak 28 ekor tikus yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai sampel penelitian.

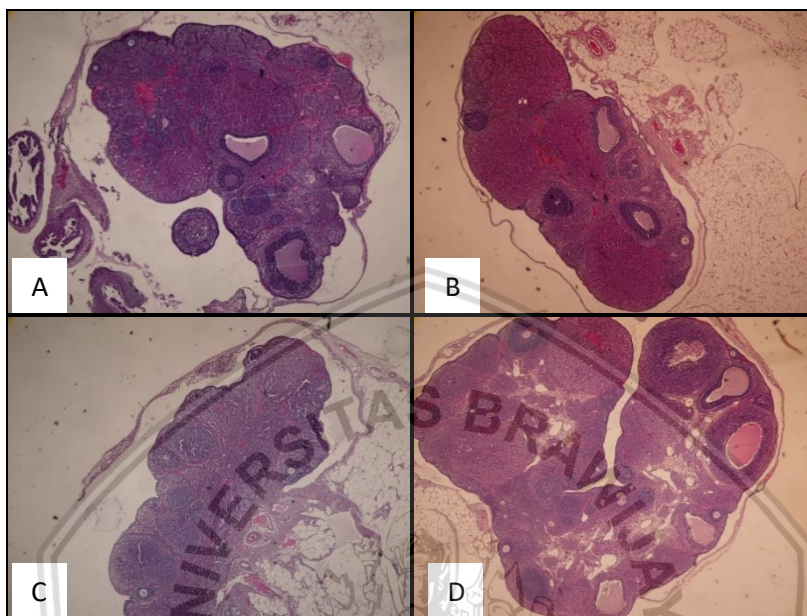
Penelitian ini menguji tentang pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap jumlah folikel ovarium pada tikus putih. Aklimatisasi selama 1 minggu dilakukan sebelum pemberian ekstrak tempe untuk menyeragamkan pola hidup tikus. Pemberian ekstrak tempe dilakukan selama 28 hari. Hewan coba pada penelitian ini dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu: 1) kelompok kontrol tikus tanpa pemberian ekstrak tempe, 2) kelompok P1, tikus yang diberi ekstrak tempe dengan dosis 7,5 mg/200grBB/hari, 3) kelompok P2, tikus yang diberi ekstrak tempe dengan dosis 15 mg/200grBB/hari, 4) kelompok P3, tikus yang diberi ekstrak tempe dengan dosis 30mg/200grBB/hari. Tikus dibedah setelah selesai perlakuan selama 28 hari pada fase siklus estrus.

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Pengamatan Mikroskopis Ovarium Tikus Putih Setelah Pemberian Ekstrak Tempe

Pengamatan irisan ovarium tikus dapat diawali dengan pembesaran 100x (gambar 5.1). Pada pembesaran 100x belum dapat diamati jenis folikel. Jenis-

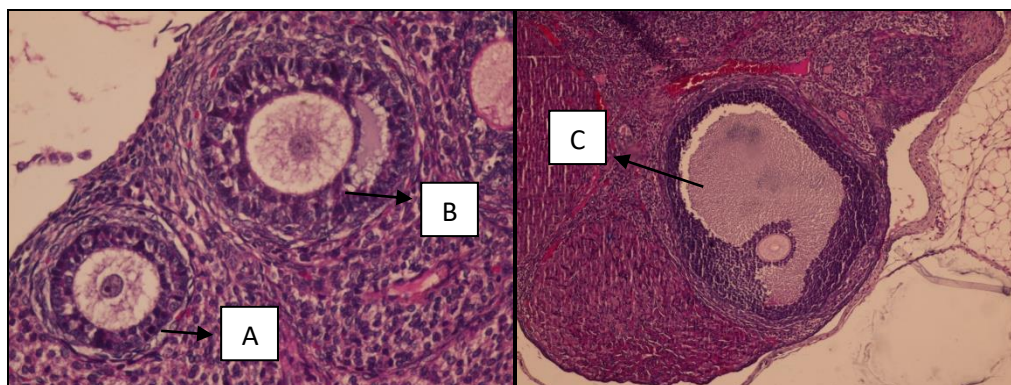
jenis folikel diamati dengan pembesaran 400x, selanjutnya dihitung jumlah folikel yang terdapat dalam ovarium (gambar 5.2).

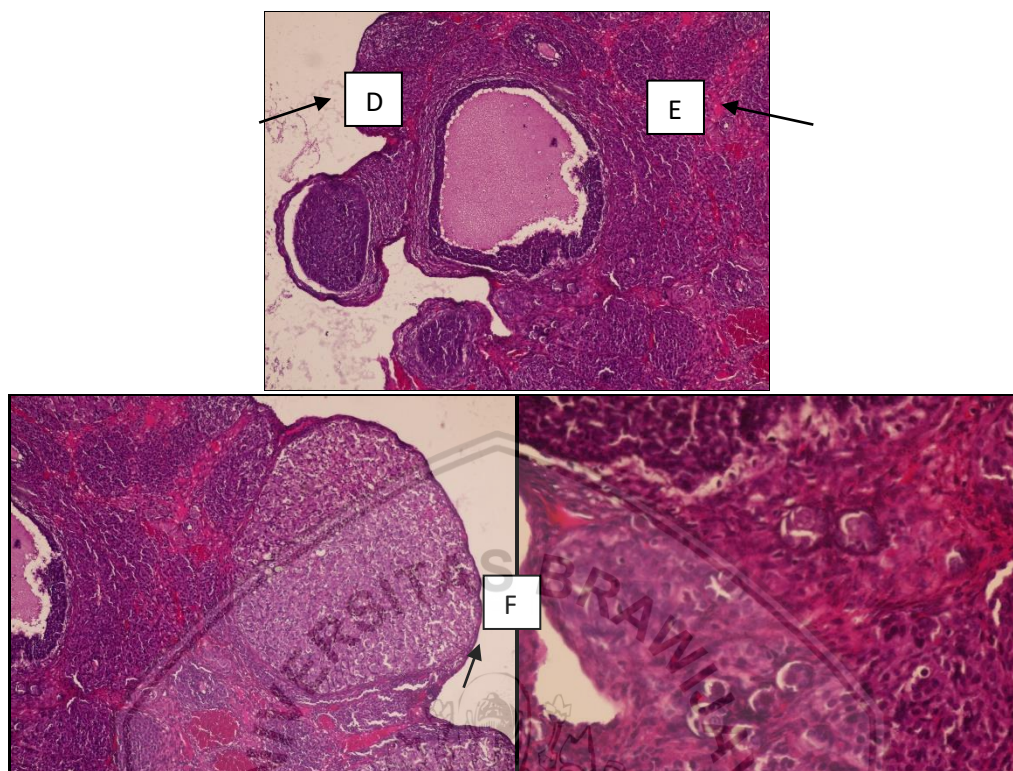


**Gambar 5.1** Gambaran mikroskopis irisan ovarium tikus putih

Keterangan: Gambaran mikroskopis irisan ovarium dengan pewarnaan HE dan pembesaran 100x. (A) Kelompok Kontrol (0 mg), (B) Kelompok Perlakuan I (7,5 mg/200grBB/hari), (C) Kelompok Perlakuan II (15 mg/200grBB/hari) dan (D) Kelompok Perlakuan III (30 mg/200grBB/hari).

Penghitungan jumlah folikel dilakukan pada sediaan preparat menggunakan mikroskop *Olympus E330* dengan pembesaran 400x. Folikel yang dihitung adalah folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff, folikel atresia. Gambaran folikel dapat diamati pada gambar 5.2.





**Gambar 5.2** Gambaran mikroskopis jenis folikel ovarium

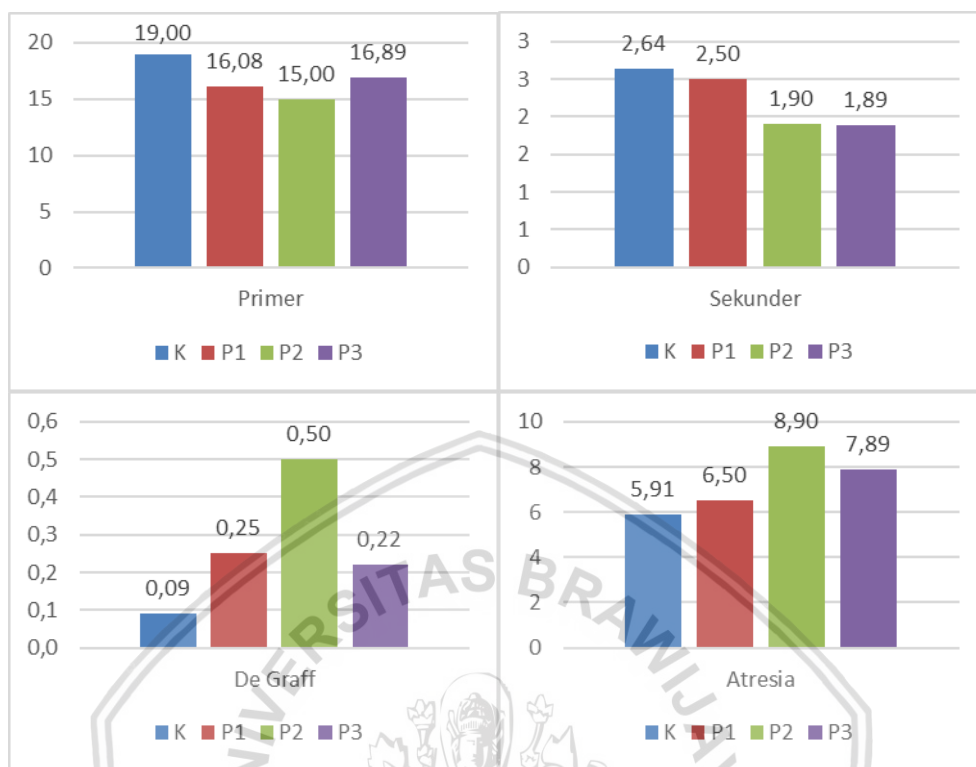
Keterangan: Gambaran mikroskopis jenis folikel ovarium: (A) folikel primer, (B) folikel sekunder, (C) folikel de graff, (D) folikel atresia, (E) corpus luteum dan (F) folikel primordial.

**Tabel 5.1** Rerata Jumlah Folikel Ovarium Tikus

Kelompok	Folikel Primer	Folikel Sekunder	Folikel De Graff	Folikel Atresia
Kontrol	19.00±7.707	2.64±2.420	0.09±0.302	5.91±3.145
P1	16.08±11.221	2.50±2.680	0.25±0.452	6.50±4.523
P2	15.00±4.925	1.90±2.079	0.50±0.527	8.90±5.547
P3	16.89±5.231	1.89±0.928	0.22±0.441	7.89±3.919

Keterangan: Rerata jumlah folikel ovarium tikus±standar deviasi: Kelompok kontrol (0 mg/200grBB), kelompok Perlakuan I (7,5 mg/200 grBB), kelompok Perlakuan II (15 mg/200 grBB) dan kelompok Perlakuan III (30 mg/200grBB).





**Gambar 5.3 Diagram Batang Rerata Jumlah Folikel Ovarium Tikus**

Keterangan: Diagram batang rerata jumlah folikel ovarium tikus: folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia. K = Kelompok kontrol (0 mg); P1 = Kelompok Perlakuan 1 (7,5 mg/200grBB/hari); P2 = Kelompok Perlakuan 2 (15 mg/200grBB/hari); P3 = Kelompok Perlakuan 3 (30 mg/200grBB/hari)

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Pengujian Normalitas Data Jumlah Folikel Ovarium Tikus

Pengujian normalitas data jumlah folikel ovarium tikus bertujuan untuk mengetahui normal tidaknya sebaran/distribusi data folikel ovarium tikus. Pengujian normalitas data jumlah folikel ovarium tikus menggunakan *Shapiro-Wilk* dengan kriteria keputusan, yaitu bila nilai Sig. atau *p-value* lebih besar dari taraf signifikansi  $\alpha = 0.05$  maka data memiliki distribusi normal dan sebaliknya bila Sig. atau *p-value* lebih kecil dari taraf signifikansi  $\alpha = 0.05$  maka data tidak terdistribusi normal. Hasil pengujian normalitas data jumlah folikel ovarium tikus dapat dilihat melalui tabel dibawah ini.

**Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Data Jumlah Folikel Ovarium.**

Variabel	<i>p-value</i>	Distribusi
Jumlah folikel primer	0.008	Tidak Normal
Jumlah folikel sekunder	0.000	Tidak Normal
Jumlah folikel de graff	0.000	Tidak Normal
Jumlah folikel atresia	0.017	Tidak Normal

Keterangan: Jika *p-value* > 0.05 maka data terdistribusi normal

Jumlah folikel ovarium berdasarkan tabel 5.2 dapat diketahui bahwa jumlah folikel primer, sekunder, de graff dan atresia memiliki distribusi data yang tidak normal dikarenakan masing-masing variabel memiliki *p-value* < 0.05. Untuk data yang berdistribusi tidak normal akan dilanjutkan uji statistik non parametrik karena asumsi data parametrik tidak terpenuhi.

### 5.2.2 Pengujian Perbedaan Pengaruh Ekstrak Tempe Terhadap Jumlah Folikel Ovarium pada Tikus Putih Strain Wistar

#### 5.2.2.1 Uji *Kruskal Wallis*

Pengujian pengaruh ekstrak tempe terhadap jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia pada ovarium tikus menggunakan uji *Kruskal Wallis* dikarenakan prasyarat *One Way Anova* tidak terpenuhi. Uji ini merupakan uji non parametrik yang digunakan untuk menguji perbedaan *rank of scores* dari tiga kelompok atau lebih yang tidak berpasangan. Perbedaan pada kedua kelompok dianggap signifikan bila *p-value* < 0,05. Hasil pengujian pengaruh ekstrak tempe terhadap jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia pada ovarium tikus dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

**Tabel 5.3 Tabel *Kruskal Wallis***

Variabel	<i>p-value</i>	Hasil
Jumlah folikel primer	0.489	Tidak Signifikan
Jumlah folikel sekunder	0.894	Tidak Signifikan
Jumlah folikel de graff	0.206	Tidak Signifikan
Jumlah folikel atresia	0.474	Tidak Signifikan

Keterangan: Jika  $p\text{-value} < 0.05$  maka data signifikan dan bila  $p\text{-value} > 0.05$  maka data tidak signifikan

Tabel 5.3 menjelaskan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap rerata jumlah folikel primer, sekunder, de graff dan atresia pada ovarium tikus putih karena memiliki nilai Sig.  $> 0.05$ .

### 5.2.2.2 Uji Mann Whitney

Uji *Mann Whitney* dapat digunakan untuk mengetahui perbedaan antara dua nilai tengah (mean) dari dua data sampel yang berasal dari populasi berbeda dan memiliki distribusi data tidak normal.

Tabel 5.4 Tabel *Mann Whitney*

Jenis Folikel	Kelompok	$p\text{-value}$	Hasil
Jumlah folikel primer	K dan P1	0,294	Tidak Signifikan
	K dan P2	0,215	Tidak Signifikan
	K dan P3	0,675	Tidak Signifikan
Jumlah folikel sekunder	K dan P1	0,778	Tidak Signifikan
	K dan P2	0,515	Tidak Signifikan
	K dan P3	0,785	Tidak Signifikan
Jumlah folikel de graff	K dan P1	0,325	Tidak Signifikan
	K dan P2	0,043	Signifikan
	K dan P3	0,425	Tidak Signifikan
Jumlah folikel atresia	K dan P1	0,805	Tidak Signifikan
	K dan P2	0,177	Tidak Signifikan
	K dan P3	0,251	Tidak Signifikan

Keterangan: Jika  $p\text{-value} < 0.05$  maka data signifikan dan bila  $p\text{-value} > 0.05$  maka data tidak signifikan. K = kelompok kontrol; P1 = kelompok perlakuan 1; P2 = kelompok perlakuan 2; P3 = kelompok perlakuan 3.

Tabel 5.4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan hanya pada jumlah folikel de graff antara kelompok kontrol dengan kelompok P2 karena memiliki  $p\text{-value} < 0,05$ .

### 5.2.2.3 Korelasi pada Jumlah Folikel Ovarium Tikus

Uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala non parametrik. Kriteria hasil yang didapatkan dari uji ini adalah jika sig.  $> 0.05$  maka tidak ada korelasi antara dua variabel, bila kekuatan korelasi  $> 0.5$  maka korelasi cukup kuat dengan arah

korelasi positif maka dapat disimpulkan bahwa arah korelasi searah. Hasil uji korelasi dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

**Tabel 5.5 Hasil Uji Korelasi Spearman**

Kelompok	Sig.	Korelasi Spearman
Jumlah folikel primer	0.795	- 0.041
Jumlah folikel sekunder	0.717	- 0.058
Jumlah folikel de graff	0.236	0.187
Jumlah folikel atresia	0.147	0.227

Tabel 5.5 menunjukkan bahwa pada jumlah folikel primer dan folikel sekunder tidak ditemukan adanya korelasi antara dosis dan jumlah folikel primer maupun folikel sekunder. Hasil koefisien korelasi pada jumlah folikel primer dan sekunder menunjukkan hampir tidak ada korelasi antara variabel dosis dan jumlah dan memiliki arah korelasi yang berlawanan dimana bila dosis yang diberikan semakin tinggi maka jumlah folikel primer dan sekunder semakin rendah.

Hasil signifikansi pada uji korelasi jumlah folikel de graff dan folikel atresia juga menunjukkan tidak adanya korelasi antara dosis dan jumlah folikel de graff maupun folikel atresia. Hasil koefisien korelasi pada jumlah folikel de graff menunjukkan hampir tidak ada korelasi antara variabel dosis dan jumlah folikel de graff sedangkan hasil koefisien folikel atresia menunjukkan adanya korelasi yang rendah antara dosis dan jumlah folikel atresia. Berdasarkan arah korelasi yang dimiliki folikel de graff dan folikel atresia menunjukkan adanya arah korelasi yang searah yakni bila dosis yang diberikan semakin tinggi maka jumlah folikel de graff dan folikel atresia yang ditemukan semakin tinggi pula.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Hasil perhitungan terhadap jumlah folikel ovarium pada setiap kelompok menunjukkan tidak adanya hubungan yang signifikan. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah folikel de graff pada kelompok kontrol dengan kelompok P2.

Kelompok kontrol merupakan tikus betina yang tidak diberikan ekstrak tempe. Kelompok perlakuan dibedakan menjadi kelompok P1 yang diberikan ekstrak tempe sebanyak 7,5 mg/200grBB/hari, P2 diberikan ekstrak tempe sebanyak 15 mg/200grBB/hari dan P3 diberikan ekstrak tempe sebanyak 30 mg/200grBB/hari. Dosis pada tikus yang dikonversikan pada anak perempuan usia 10 tahun ( $BB \pm 32$  kg) hingga anak perempuan usia 20 tahun ( $BB \pm 50$  kg) diperoleh hasil setiap anak akan mendapatkan tempe (5 x jumlah dosis ekstrak) sebanyak P1 = 0,96 g - 1,5 g; P2 = 1,92 gr - 3g; P3= 3,84 g - 6 g per hari per anak.

Hasil analisis pada uji *Kruskal Wallis* didapatkan *p-value* kurang dari 0,05 pada folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia. Sehingga disimpulkan bahwa tidak adanya perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak tempe terhadap jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de graff dan folikel atresia. Uji Mann Whitney pada kelompok kontrol folikel de graff dengan kelompok P2 menunjukkan hasil yang signifikan yakni *p-value* sebesar 0,042.

Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis dapat menurunkan rerata jumlah folikel primer dan folikel sekunder serta akan

meningkatkan rerata jumlah folikel de graff dan folikel atresia meskipun hasilnya tidak secara signifikan.

Fitoestrogen disebut memiliki kerja *selective action* yakni ketika kadar estrogen dalam keadaan normal, fitoestrogen akan bersifat antagonis terhadap estrogen endogen sedangkan pada kadar yang rendah seperti saat menopause, fitoestrogen akan bersifat proestrogenik (Cvejic', et al., 2012). Hasil penelitian ini tidak selaras dengan hasil penelitian dari Azizah (2016) yang menunjukkan bahwa pemberian susu kedelai pada tikus usia 4-8 minggu dapat menurunkan jumlah folikel ovarium secara signifikan pada tikus.

Pemberian ekstrak tempe dimulai saat tikus berusia 4 minggu, dimana bila disetarakan dengan manusia merupakan masa anak-anak. Pemberian sejak usia 4 minggu – 8 minggu dianggap sebagai perlakuan pada tikus yang mulai memasuki usia pubertas. Menurut Sofronescu (2015), kadar estrogen pada masa anak-anak jumlahnya tidak terdeteksi hingga sebesar 20 pg/ml sedangkan pada dewasa saat fase folikuler, jumlahnya sebesar 96-436 pg/ml. Kadar yang lebih rendah dan disertai belum matangnya HPO (Hipofisis Pituitari dan Ovarium) axis menyebabkan sensitifitas terhadap senyawa estrogenik eksogen lebih tinggi dibandingkan pada dewasa.

Fitoestrogen merupakan salah satu kandungan yang terdapat pada tempe, memiliki kemampuan berikatan dengan reseptor estrogen baik mengaktifkan maupun memblokirnya. Kemampuan tersebut bergantung pada kadar estrogen yang ada, sehingga dapat muncul efek estrogenik maupun anti estrogenik. Menurut Satyaningtjas (2014), senyawa estrogen non steroid lebih sering berikatan dengan reseptor estrogen  $\beta$  dibandingkan dengan reseptor

estrogen  $\alpha$ . Ekspresi reseptor  $\beta$  utamanya terjadi pada sel granulosa ovarium (Hamilton, et al., 2017).

Reseptor  $\beta$  dapat ditemukan pada nukleus sel granulosa. Jumlah RE  $\beta$  pada sel granulosa lebih banyak ditemukan pada folikel de graff ( $38.74 \pm 12.07$ ) dibandingkan dengan folikel sekunder dan folikel atresia ( $15.67 \pm 9.45$ ;  $16.58 \pm 12.41$ ) (Salvetti, et al., 2007). Sedangkan RE  $\alpha$  terdapat pada epitel germinal, sel intersisial dan sel teka (Lowe & Anderson, 2008; Mescher, 2016).

Kadar FSH dan LH pada awal siklus relatif tinggi dan memacu perkembangan 10-20 folikel primer dengan satu folikel dominan, sehingga sisa folikel lainnya akan mengalami atresia. Saat ukuran folikel meningkat akan terjadi lokalisasi akumulasi cairan disekitar sel granulosa yang disebut antrum. Hormon estrogen akan meningkat seiring dengan perkembangan folikel. Kenaikan yang progresif dalam produksi estrogen tersebut akan berpengaruh terhadap pematangan folikel. Gonadotropin akan ditekan karena adanya peningkatan hormon estrogen sebagai umpan balik negatif agar tidak terjadi adanya hiperstimulasi ovarium dan pematangan banyak folikel (Sofowean, 2014).

Fitoestrogen menunjukkan adanya kemungkinan efek *endocrine disruptors*. Adanya manfaat ataupun bahaya dari fitoestrogen bagi kesehatan masih belum terpecahkan. Hal ini memiliki dipengaruhi oleh hal yang kompleks dan dapat bergantung pada usia, status kesehatan dan ada tidaknya mikroflora usus (Patisaul & Jefferson, 2010).

Fitoestrogen pada in vitro dapat menunjukkan sifat agonis baik pada RE  $\alpha$  maupun RE  $\beta$ . Meskipun ikatannya lebih kuat pada RE  $\beta$ . Fitoestrogen pada in vivo dapat juga bersifat antiestrogenik dengan cara menginduksi *sex hormone binding globulin* (SHBG). SHBG merupakan glikoprotein yang mengikat dua

hormon sex yaitu estrogen dan androgen. Saat terjadi induksi pada SHBG maka biosintesa estrogen akan menurun (Talsness, et al., 2015).

Fitoestrogen merupakan kompetitor estrogen dalam mengikat reseptornya, sehingga estrogen alami tidak dapat berikatan dengan reseptor tersebut (Suparman, 2014). Kadar estrogen bebas dalam darah akan meningkat akibat dari reseptor yang diduduki oleh fitoestrogen. Peningkatan estrogen akan menimbulkan umpan balik negatif sehingga GnRH akan berespon untuk menurunkan kadar FSH yang berfungsi sebagai hormon yang menstimulasi perkembangan sel folikel. Penurunan FSH akan diikuti oleh penurunan produksi estrogen yang terjadi karena folikel berhenti berkembang (Azizah, 2016).

Fitoestrogen memiliki efek estrogenik yang lebih rendah dibandingkan dengan estrogen endogen. Efek tersebut juga tidak dapat menunjang mekanisme kerja estrogen sehingga menyebabkan gangguan neuroendokrin yang dapat menyebabkan tertekannya perkembangan folikel ovarium (Mardiati, 2008).

Sekresi hormon FSH yang diproduksi kelenjar pituitari akan menginduksi perkembangan sel granulosa membentuk folikel primer. Sel granulosa akan terus berkembang dan menebal. Bagian stroma akan berdiferensiasi menjadi sel teka interna dan sel teka eksterna. Folikel tersebut akan disebut dengan folikel sekunder. Perkembangan folikel tersebut bergantung pada keseimbangan hormon dan perbedaan jumlah reseptor FSH, aktivitas aromatase, sintesis estrogen dan variabel lainnya dalam folikel (Lowe & Anderson, 2008; Mescher, 2016).

Pemberian fitoestrogen yang menyebabkan kadar estrogen bebas dalam darah meningkat akan direspon oleh hipotalamus dan hipofisis untuk



menghentikan sekresi dari hormon FSH. Penghentian produksi FSH dan ketidakseimbangan hormon akan menyebabkan perkembangan folikel primer dan folikel sekunder terhenti, sehingga didapatkan adanya penurunan terhadap jumlah folikel primer dan jumlah folikel sekunder. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan jumlah rata-rata pada folikel primer dan folikel sekunder pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Perkembangan folikel de graff dipengaruhi pula oleh adanya hormon estrogen. Hormon estrogen akan membantu proses ovulasi dan meningkatkan serta mempercepat terbentuknya folikel de Graff (Mastuti & Ciptono, 2017). Estrogen juga akan membantu pematangan folikel. Sehingga dengan adanya peningkatan kadar estrogen dalam darah akibat paparan fitoestrogen dianggap mampu meningkatkan jumlah folikel de graff yang matang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata jumlah folikel de graff pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol terutama adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 2 dengan kelompok kontrol.

Pengaruh meningkatnya jumlah folikel de graff terhadap keadaan fertilitas seseorang perlu diperhatikan karena pada penelitian sebelumnya menunjukkan adanya penurunan kadar LH yang berfungsi untuk ovulasi setelah pemberian fitoestrogen. Terdapat adanya penelitian yang menunjukkan kegagalan tikus menjadi hamil setelah dikawinkan dengan tikus jantan, sehingga terdapat resiko terjadinya infertilitas setelah pemberian fitoestrogen, meskipun jumlah folikel de graff ditemui dalam jumlah yang tinggi (Zin, et al., 2013).

Paparan fitoestrogen juga dapat mengakibatkan adanya perubahan morfologi dengan apoptosis pada sel granulosa dan sel oosit. Adanya perubahan

morfologi tersebut akan berpengaruh terhadap fungsi mitokondria dan mempengaruhi *signal pathway* terjadinya apoptosis terhadap sel-sel granulosa ovarium (Azizah, 2016; Tingen, et al., 2009). Folikel yang mati ditandai dengan adanya akumulasi vakuola dan rupturnya mitokondria dan inti sel (Tingen, et al., 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Azizah (2016) menjelaskan adanya indikasi bahwa fitoestrogen akan mempengaruhi aktivasi dari reseptor estrogen. Adanya *feedback negative* akibat pengaruh ikatan fitoestrogen yang membuat kadar FSH rendah dan mengakibatkan perkembangan folikel terganggu sehingga terjadi apoptosis pada sel granulosa. Terjadinya apoptosis pada folikel tersebut menyebabkan adanya peningkatan terhadap jumlah folikel atresia karena pemberian fitoestrogen. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa rata-rata jumlah folikel atresia pada kelompok kontrol lebih rendah daripada kelompok perlakuan, meskipun tidak bermakna secara signifikan.

Peningkatan jumlah folikel atresia dapat berpengaruh terhadap rentang usia reproduksi seseorang (Talsness, et al., 2015). Jumlah folikel ovarium juga dapat berkaitan dengan usia menopause seorang individu karena semakin cepat kehilangan folikel maka semakin muda orang tersebut mengalami menopause (Depmann, et al., 2015; Santoro & Jr., 2011).

Penggunaan fitoestrogen dalam suplementasi diet perlu diperhatikan karena adanya beberapa laporan terkait pengaruhnya terhadap sistem reproduksi wanita. Adanya perubahan pada perkembangan organ reproduksi dapat mempengaruhi pula pada fungsi sistem reproduksi perempuan tersebut.

Perubahan jumlah folikel pada penelitian ini bergantung jenis folikel dan jumlah dosis yang diberikan. Penelitian ini dapat pula dilanjutkan untuk mencari dosis yang efektif berpengaruh terhadap jumlah folikel ovarium.

Beberapa keterbatasan yang perlu dilakukan pada penelitian selanjutnya adalah keterbatasan waktu penelitian sehingga tidak dapat menggambarkan secara jelas bagaimana pengaruh diet tempe yang mengandung fitoestrogen terhadap ovarium hingga keadaan dewasa sehingga selanjutnya perlu penelitian dengan menambah waktu perlakuan. Kadar estrogen pada tikus tidak terkaji sehingga untuk melengkapi asumsi perlu ditambahkan adanya variabel kadar estrogen saat dilakukan pembedahan. Selain itu diperlukan adanya penambahan jumlah sampel untuk mendapatkan hasil yang lebih representatif.

Penelitian ini tidak melakukan uji kadar isoflavon dikarenakan adanya keterbatasan pada alat dan dana, sehingga pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pula uji kadar isoflavon pada tempe yang digunakan untuk mengurangi bias pada penelitian.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

7.1.1 Pemberian ekstrak tempe pada tikus putih secara umum tidak berpengaruh terhadap penurunan jumlah folikel pada ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar.

7.1.2 Terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah folikel de graff pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2.

#### 7.2 Saran

7.2.1 Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengkaji dosis efektif yang dapat berpengaruh terhadap penurunan jumlah folikel ovarium.

7.2.2 Diperlukan penambahan waktu penelitian untuk adanya hubungan waktu dengan penurunan jumlah folikel ovarium pada penelitian selanjutnya.

7.2.3 Diperlukan penambahan jumlah sampel pada penelitian selanjutnya agar hasil yang didapatkan dapat lebih representatif.

7.2.4 Pada penelitian selanjutnya dapat dipertimbangkan untuk penambahan jumlah variabel lain seperti pengukuran kadar  $17\beta$ - estradiol agar asumsi pengaruh fitoestrogen terhadap kadar hormon estrogen dapat terpenuhi.

7.2.5 Agar hasil penelitian tidak menimbulkan bias dapat dilakukan pengujian kadar isoflavon pada tempe yang digunakan.

7.2.6 Konsumsi produk tempe dapat dilanjutkan karena belum adanya dosis yang efektif berpengaruh terhadap sistem reproduksi manusia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aiman, J., 1984. *Infertility Diagnosis and Management*. New York: Springer Verlag.
- Akbar, B., 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Astawan, M., 2009. *Sehat Dengan Hidangan Kacang dan Biji-bijian*. Depok: Penebar Swadaya.
- Austin, C. R. & Short, R. V., 1984. *Hormonal Control of Reproduction*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Azizah, E.N. 2016. *Pengaruh Pemberian Susu Kedelai Sejak Usia 4 Minggu Hingga 8 Minggu Terhadap Kadar  $17\beta$ - Estradiol Dan Jumlah Folikel Ovarium Pada Tikus Betina*. Thesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B. & Holden, J. M., 2008. *USDA Database for the Isoflavone Release 2.0*. Beltsville, U.S. Department of Agriculture, p. 28.
- Baird DT, Balen A, Morreale HF, Evers JL, Fauser BC, Franks S. Health and fertility in Azizah, E.N. 2016. *Pengaruh Pemberian Susu Kedelai Sejak Usia 4 Minggu Hingga 8 Minggu Terhadap Kadar  $17\beta$ - Estradiol Dan Jumlah Folikel Ovarium Pada Tikus Betina*. Thesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A. & Nygren, K. G., 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), p. 1506–1512.
- BSN, 2015. *Tempe Kedelai SNI 3144:2015*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Carmichael, S. L., Gonzalez-Feliciano, A. G., Ma, C., Shaw, G. M. & Cogswell, M. E., 2011. Estimated dietary phytoestrogen intake and. *Nutrition Journal*, Volume 10, p. 105.
- Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Gjinovci, A., Kühne, F., Klein, M., Cederroth, M., Caille, D., Suter, M., Neumann, D., James, R. W., Doerge, D. R., Walliman, T., Meda, P., Foti, M. & Nef, 2008. Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes*, 57(5), pp. 1176-1185.
- Chen, Y., Jefferson, W. N., Newbold, R. R., Padilla-Banks, E. & Pepling, M. E., 2007. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte. *Endocrinology*, 148(8), pp. 3580-3590.



- Clinical guideline [CG11], 2013. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. *National Institute for Health and Care Excellence*.
- Coad, J. & Dunstall, M., 2006. *Anatomi dan Fisiologi untuk Bidan*. Jakarta: EGC.
- Cordeiro, M. H., Kim, S.-Y. & Woodruff, T. K., 2015. Ovarian Follicle Biology and the Basis. Dalam: *Cancer Treatment and the Ovary*. San Diego: Academic Press, pp. 4-14.
- Cvejić, J., Bursać, M. & Atanacković, M., 2012. Phytoestrogens: “Estrogene-Like” Phytochemicals. Dalam: *Studies in Natural Products Chemistry*. Serbia: Elsevier, pp. 1-16.
- Depmann, M., Faddy, M. J., Schouw, Y. T., Peeters, P. H. M., Broer, S. L., Kelsey, T. W., Nelson, S. M. & Broekmans, F. J. M., 2015. The Relationship Between Variation in Size of the Primordial Follicle Pool and Age at Natural Menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), p. E845–E851.
- Dwinaningsih, E.A. 2010. *Karakteristik Kimia Dan Sensori Tempe Dengan Variasi Bahan Baku Kedelai/Beras Dan Penambahan Angkak Serta Variasi Lama Fermentasi*. Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Gaba, F. M. & Bhattacharya, S., 2015. An Overview of Infertility. Dalam: *Reference Module in Biomedical Sciences*. UK: Elsevier, p. 1.
- Hamilton, K.J., Hewitt, S.C., Arao, Korach, K.S. 2017. Estrogen Hormone Biology. (Abstract). *Current Topics in Developmental Biology*, 125: 109-146.
- Hestiantoro, A., 2014. *Ilmu Kandungan*. Jakarta: PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
- Hoffman, B. L. Schorge, J. O., Bradshaw, K. D., Halvorson, L. M., Schaffer, J. I. & Corton, M. M., 2012. *Williams Gynecology*. 3th penyunt. Dallas: McGraw-Hill.
- Iskandar, Y. M. & Priatni, S., 2008. Isoflavones Aglicone Of Tempe Malang Fried Slices. *Indo. J. Chem.*, 8(3), pp. 437-442.
- Karlina, Y. 2003. *Siklus Estrus dan Struktur Histologis Ovarium Tikus Putih (Rattus norvegicus) Setelah Pemberian Alprazolam*. Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Kuehnel, W., 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy*. 4th penyunt. Atlanta: Thieme.
- Kusumawati, D., 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

- Lowe, J. S. & Anderson, P. G., 2008. *Stevens & Lowe's Human Histology*. Philadelphia: Elsevier.
- Mardiati, S. M. & Sitasiwi, A. J., 2008. Korelasi Jumlah Folikel Ovarium dengan Konsentrasi Hormon Estrogen Mencit (*Mus musculus*) setelah Konsumsi Harian Tepung. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, XVI(2).
- Masoum, S. Z., Parsa, P., Darvish, N., Mokhtari, S., Yavangi, M. & Roshanaei, G., 2015. An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemieh Hospital in Hamadan. *Iran J Reprod Med.*, 13(8), pp. 513-516.
- Mastuti, R. Q. D. & Ciptono, 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*, L.) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putis (*Rattus norvegicus*, L.). *Journal Student UNY*, 6(3), p. 131.
- Mescher, A. L., 2016. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. 14th penyunt. Indiana: McGraw-Hill Education.
- Meziane, H., Ouagazzal, A.-M. & Aubert, L., 2007. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. *Genes, Brain and Behavior*, Volume 6, pp. 192-200.
- Muhiddin, ST. N. M. 2013. *Peran Ekstrak Tempe Pada Masa Prapubertas Kinerja Reproduksi Tikus Betina Rattus norvegicus*. Skripsi. Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Norman, A. W. & Litwack, G., 2015. Estrogens and Progestins. Dalam: *Hormones*. Riverside: Academic Press, pp. 275-296.
- Otto, G. M., Franklin, C. L. & Clifford, C. B., 2015. Biology and Diseases of Rats. Dalam: *Laboratory Animal Medicine*. 3th penyunt. USA: Academic Press, pp. 151-207.
- Partodihardjo, S., 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Mutiara Jakarta.
- Prabowo, H.A. 2014. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai (Glycine max, L.) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus, L.)*. (Abstract). Skripsi. Diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Univeritas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta. Primiani, C. N., 2013. Potensi Tepung Tempe sebagai Estrogen Alami terhadap Uterus Mencit Premenopause. *Sains & Matematika*, 1(2), pp. 47-51.
- PUSIDO Badan Standardisasi Nasional, 2012. *Tempe: Persembahan Indonesia Untuk Dunia*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Rendi, M. H., Muehlenbachs, A., Garcia, R. L. & Boyd, K. L., 2012. Female Reproductive System. Dalam: *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. USA: Academic Press, pp. 253-261.

- Salveti, N. R., Acosta, J. C., Gimeno, E. J., Muller, L. A., Mazzini, R. A., Taboada, A. F. & Ortega, H. H., 2007. Estrogen Receptors a and b and Progesterone Receptors in Normal Bovine Ovarian. *Vet Pathol*, Volume 44, pp. 373-378.
- Santoro, N. & Jr., J. F. R., 2011. Reproductive Hormones and the Menopause Transition. *Obstet Gynecol Clin North Am.*, 38(3), pp. 455-466.
- Santoso, H., 2006. *Pembuatan Tempe dan Tahu Kedelai Bahan Makanan Bergizi Tinggi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sarwono, B., 2010. *Usaha Membuat Tempe dan Oncom*. Depok: Penebar Swadaya.
- Satyaningtjas, A. S., Maheshwari, H., Achmadi, P., Pribadi, W. A., Hapsari, S., Jondriatno, D., Bustaman, I. & Kiranadi, B., 2014. Kinerja Reproduksi Tikus Bunting Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8(1), pp. 35-37.
- Sharif, P. S., Nikfar, S. & Abdollahi, M., 2011. Prevention of bone resorption by intake of phytoestrogens in postmenopausal women: a meta-analysis. *Age*, Volume 33, pp. 421-431.
- Sindarti, G.M. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Ethanol Kedelai (Glycine max) Pada Folikulogenesis Ovarium Mencit (Mus Musculus)*. (Abstrak). Thesis. Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sirois, M., 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principle and Procedures*. Washington: Elsevier Press.
- Siswanto, 2014. *Buku Survei Konsumsi Makanan Individu dalam Studi Diet Total 2014*. Jakarta: Lembaga Penerbitan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Sloane, E., 2003. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula*. Jakarta: EGC.
- Sofowan, M. S., 2014. Endometrium dan Desidua. Dalam: *Ilmu Kebidanan Sarwono Prawirohardjo*. Jakarta: PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, pp. 130-138.
- Sofronescu, A.G. 2015. Estradiol, Nebraska United States. <https://emedicine.medscape.com/article/2089003-overview>.
- Sreenivasan, L., 2015. Nutrition and Hormones: Role in Male Infertility. Dalam: *Handbook of Infertility*. Arizona: Elsevier, p. 237.
- Suarsana, I. N., Priosoeryanto, B. P., Wresdiyati, T. & Bintang, M., 2010. Sintesis Glikogen Hati dan Otot pada Tikus Diabetes. *Jurnal Veteriner*, 11(3), pp. 190-195.



- Sudha, G. & Reedy, K., 2013. Causes of Female Infertility: A Cross-sectional Study. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 2(6), pp. 119-123.
- Sumapraja, K. & Wiweko, B., 2014. Dasar-dasar Konsepsi Buatan. Dalam: *Ilmu Kebidanan Sarwono Prawirohardjo*. Jakarta: PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, pp. 88-89.
- Suparman, E., 2014. *Fitoestrogen/HRT: Pro dan Kontra*. Manado: Kalbe.
- Suprpti, M. L., 2007. *Pembuatan Tempe*. Yogyakarta: Kanisius.
- Talsness, C. Grote, K., Kuriyama, S., Presibella, K., Sterner-Kock, A., Poça, K. & Chahoud, I., 2015. Prenatal Exposure to the Phytoestrogen Daidzein Resulted in Persistent Changes in Ovarian Surface Epithelial Cell Height, Folliculogenesis, and Estrus Phase Length in Adult Sprague-Dawley Rat Offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Volume 78, pp. 635-644.
- Tingen, C. M., Bristol-Gould, S. K., Kiesewetter, S. E., Wellington, J. T., Shea, L. & Woodruff, T. K., 2009. Prepubertal Primordial Follicle Loss in Mice Is Not Due to Classical Apoptotic Pathways. *Biology of Reproduction*, Volume 81, pp. 16-25.
- Zin, S. R. M., Omar, S. Z., Khan, N. L. A., Musameh, N. I., Das, S. & Kassim, N. M., 2013. Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats. *Clinics*, 68(2), pp. 253-262.