

**PENGARUH PERASAN DAUN SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP PERCEPATAN SIKLUS BIRAHITIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA BERDASARKAN KETEBALAN LAPISAN SEL EPITEL VAGINA DAN ULANGAN ESTRUS**

**SKRIPSI**

Oleh  
**NUR BAETY**  
**115130107111010**



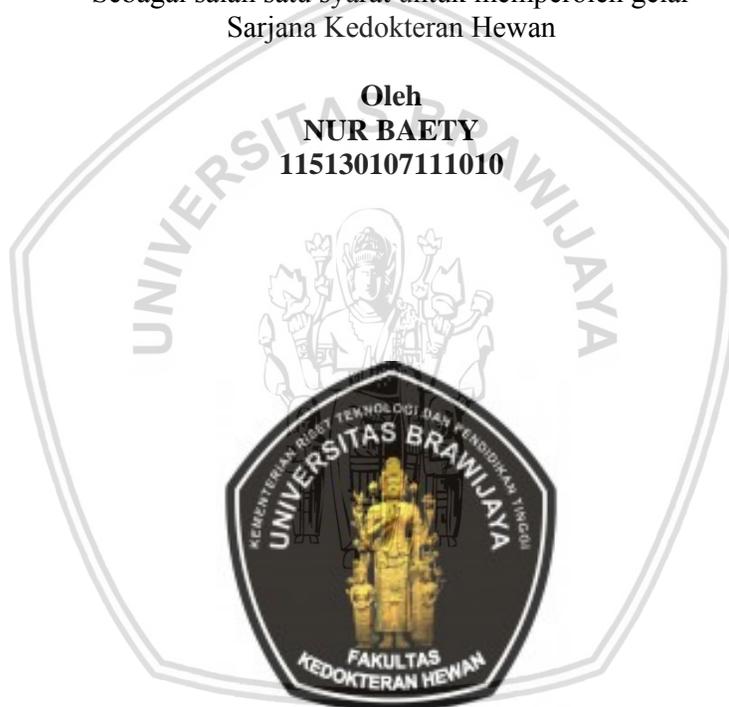
**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH PERASAN DAUN SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*) TERHADAP PERCEPATAN SIKLUS BIRAHITIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA BERDASARKAN KETEBALAN LAPISAN SEL EPITEL VAGINA DAN ULANGAN ESTRUS**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh  
**NUR BAETY**  
**115130107111010**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERANHEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**Pengaruh Perasan Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*)  
Terhadap Percepatan Siklus Birahi Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Betina Berdasarkan Ketebalan Lapisan Sel Epitel  
Vagina dan Ulangan Estrus**

Oleh:

**NUR BAETY**

115130107111010

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 18 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof.Dr.Pratiwi Trisunuwati,drh.,MS**

NIP. 19480615 197702 2 001

**drh. Fajar Shodiq, M.Biotech**

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya**Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES**

NIP.19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Baety  
NIM : 115130107111010  
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan  
Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Perasan Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Percepatan Siklus Birahi Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina berdasarkan Ketebalan Lapisan Sel Epitel Vagina dan Ulangan Estrus

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Januari 2018  
Yang menyatakan

Nur Baety  
NIM. 115130107111010

**Pengaruh Perasan Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*)  
Terhadap Percepatan Siklus Birahi Tikus (*Rattus norvegicus*)  
Betina Berdasarkan Ketebalan Lapisan Sel Epitel  
Vagina dan Ulangan Estrus**

ABSTRAK

Siklus estrus merupakan proses yang dikendalikan oleh berbagai hormon, baik hormon dari Hipotalamus-hipofisis maupun ovarium. Estrogen dapat menimbulkan respon terhadap aktivitas betina seperti: perkembangan sifat seks sekunder, perilaku persiapan kawin (estrus), mempersiapkan uterus untuk implantasi dan menyiapkan perkembangan kelenjar susu. Penggunaan bahan alami yang mengandung *estrogen-like substances* (fitoestrogen/herbal estrogen) banyak dikembangkan karena diyakini tidak menimbulkan efek samping, dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian daun semanggi air (*Marsilea crenata*) terhadap gambaran histologi vagina dan lama fase siklus birahi yang dilihat berdasarkan kornifikasi sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina. Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina dan berumur 2 bulan dengan bobot 100-150 gram. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan yakni kontrol positif, kontrol negatif, Kelompok tikus yang diberi daun semanggi air dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% selama 23 hari. Analisis data kuantitatif menggunakan *one way Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey ( $\alpha = 5\%$ ). Tebal lapisan sel epitel vagina diamati secara kuantitatif dan kornifikasi sel epitel vagina diamati melalui swab vagina. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian perasan daun semanggi air berpengaruh terhadap percepatan siklus birahi berdasarkan ketebalan lapisan sel epitel vagina dan ulangan estrus pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina.

**Kata kunci:** semanggi air, Estrus, Swab vagina

**The effect Of The Squered The Leeaf Water Clover (*Marsileacrenata*) For Acceleration Of The Cycle Of Lust Mice ( *Rattusnorvegicus* ) Femele Seen Based On The Thickness Of The Vaginal Epithelial and estrus replication**

**ABSTRACT**

The estrus cycle is a process controlled by various hormones, either hormones of the hypothalamus-pituitary as well as from the ovaries. Estrogen can make cause a response to female activities such as: the development of secondary sexual behavior, the behavior of mating preparation (estrus), preparing the uterus for implantation and preparing the development of the mammary gland. The use of natural substances containing estrogen-like substances (*phytoestrogens / estrogen herbs*) is widely developed because it is believed to have no side effects, compared with estrogen synthesis or hormonal replacement therapy (HRT). The purpose of this research is to know the effect of the leaf water clover (*Marsileacrenata*) to the histothology of vaginal and the length of the cycle of lust which is seen based on the chromosomy of vaginal epithelial cells on female mice (*Rattusnorvegicus*). Animal model using mice (*Rattusnorvegicus*) female wistar strain and 2 months old with weight 100-150 grams. This research used 6 treatment groups that were positive control, negative control, group of mice that were given clover leaves water with concentration 20%, 40%, 60%, and 80% for 23 days. Quantitative of the data analysis using one way Analisis of Variance (ANOVA) and continued with Tukey test ( $\alpha = 5\%$ ). The thickness of the vaginal epithelial cell layer was observed quantitatively and the cordification of vaginal epithelial cells was observed through the vaginal swab. The results of the study indicated that administration water from the leaves clover given the influence to acceleration of cyclical cycle, because based on the thickness of the vaginal epithelial cell layer and estrus replication in female rat (*Rattus norvegicus*)

Keywords: Leaf water clover, Estrus, Swab vaginal

## KATA PENGANTAR

Segala Puji bagi Allah SWT, Sang Maha Cinta, sehingga karena cinta-Nya penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian yang berjudul “Pengaruh Perasan Daun Semanggi Air (*Marsilea crenata*) Terhadap Percepatan Siklus Birahi Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina yang Dilihat Berdasarkan Gambaran Histologi Endometrium dan Kornifikasi Sel Epitel Vagina”.

Penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. Prof.Dr.PratiwiTrisunuwati,drh.,MS sebagai dosen pembimbing pertama. Diantara kesibukannya, beliau bersedia membimbing, memotivasi, serta membagi ilmu dengan perhatian dan kesabaran.
2. Dr.Sri Murwani drh.MP dan drh.FajarShodiqPermata,M.Biotech sebagai dosen pembimbing kedua, atas dorongan semangat, bimbingan, nasihat, kesabaran dan segala tambahan ilmu pengetahuan yang diberikan pada penulis.
3. drh. Yudit Oktanella, M.Sisebagai penguji pertama dan drh. Herlina PratiwiM.Si sebagai penguji kedua, yang telah memberikan saran dan masukan yang sangat berguna untuk memperbaiki penelitian dan penulisan skripsi.
4. Prof. Dr. Aulanni'am. drh., DES sebagai dekan Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan demi kemajuan FKH UB.
5. Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan, Laboratorium Faal Hewan Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Parasit Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, yang telah membantu penulis dalam penelitian.
6. drh. Ahmad Fauzi, M.Si dan drh. Nurina Titisari, M.Si yang telah memberikan saran dan masukan guna menyelesaikan penelitian ini.

6. Keluarga penulis, Bapak P Syaiful Ansori, Ibu S Nurul Istiqomah, Syarif Sulton dan Ahmad Baihaqi yang selalu siap memberi bantuan, dukungan semangat dan doa. Semoga Allah senantiasa menyayangi kalian.
7. Rekan-rekan satu tim penelitian Ade Margani, Titin Meisty Y dan Nurul Ika W yang telah bekerja dan berjuang bersama dalam penelitian ini.
8. Kolega-kolegaku angkatan FKH UB 2011 atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan
9. Keluarga penulis di Malang Siti Nur Jannah, Qurainiyanti, Yumeida Noor I, Aidelia citra F, Hilda Yuanti Sserta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal ini. Semoga Allah membalas dengan sesuatu yang lebih indah.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga Tugas Sarjana ini dapat bermanfaat.

Malang, 18 Januari 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Semanggi Air ( <i>Marsilea crenata</i> ) .....	6
2.2 Fitoestrogen.....	8
2.2.1 Manfaat fitoestrogen.....	9
2.3 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	10
2.4 Siklus reproduksi Tikus Betina .....	13
2.5 Organ reproduksi Betina.....	17
2.5.1 Ovarium.....	17
2.5.2 Oviduk.....	18
2.5.3 Uterus.....	18
2.5.4 Serviks.....	19
2.5.5 Vagina.....	19
2.5.6 <i>Etinilestradiol</i> .....	22
2.5.7 Phosiological zouth.....	22
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL &amp; HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	23
3.1 Kerangka Konseptual .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian.....	25
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	26
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	26
4.2 Sampel penelitian .....	26
4.3 Rancangan Penelitian .....	27

4.4 Variabel Penelitian .....	27
4.5 Materi Penelitian .....	27
4.6 Prosedur Penelitian.....	28
4.6.1 Adaptasi Hewan Coba.....	28
4.6.2 Persiapan hean coba.....	29
4.6.3 Metode swab vagina.....	29
4.6.4 Pembuatan perasan.....	30
4.6.5 Tahapan Perlakuan Pengelompokan Hewan Coba.....	31
4.6.6 Pemberian Etinilestradiol.....	32
4.6.7 Metode eutanasi.....	32
4.6.8 pembuatan preparat swab vagina.....	32
4.6.9 Pembuatan preparat Histologi.....	33
4.6.10 Pewarnaan menggunakan HE.....	35
4.6.11 Analisa Data .....	36
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>37</b>
5.1 Pengaruh pemberian perasan daun semanggi air terhadap lapisan sel epitelVagina.....	37
5.2 Pengaruh pemberian perasan daun semanggi air terhadap Ulangan estrus.....	44
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>48</b>
6.1 Kesimpulan.....	48
6.2 Saran.....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>53</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
2.1 Gambaran histologi epitel vagina.....	15
4.3 Rancangan Kelompok Penelitian.....	27
5.1 Tabel hasil pengukuran ketebalan lapisan sel epitel vagina.....	41
5.2 Tabel hasil ualangan estrus.....	44



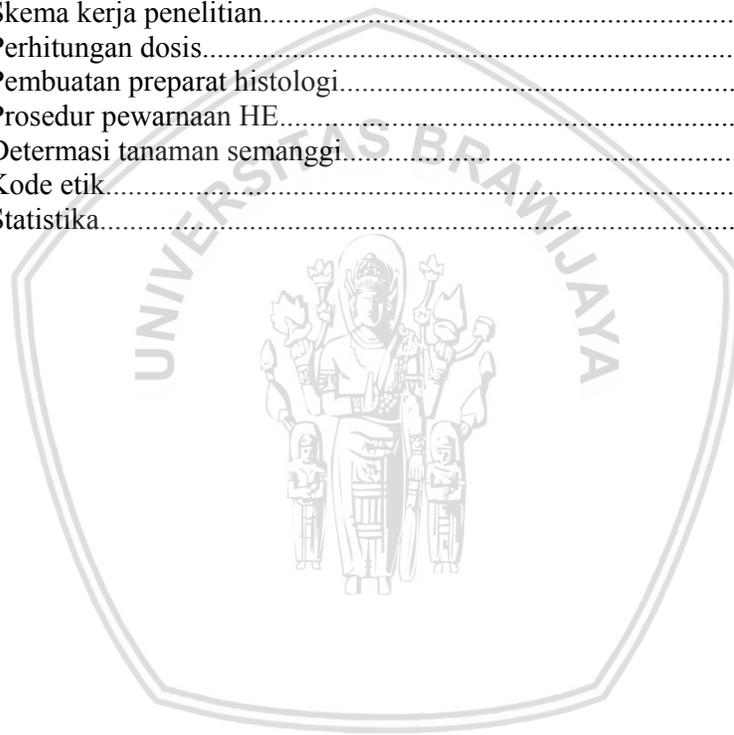
**DAFTAR GAMBAR**

2.1 Tikus *Rattus norvegicus*..... 12  
 2.2 Perubahan epitel vagina tikus..... 21  
 5.1 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 38  
 5.2 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 38  
 5.3 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 39  
 5.4 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 39  
 5.5 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 40  
 5.6 Histologi lapisan sel epitel vagina tikus putih..... 40



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Skema kerja penelitian.....	53
2. Perhitungan dosis.....	54
3. Pembuatan preparat histologi.....	55
4. Prosedur pewarnaan HE.....	56
5. Determasi tanaman semanggi.....	57
6. Kode etik.....	58
7. Statistika.....	59



**The effect Of The Distilation The Leeaf Water Clover (*Marsilea crenata*) For Acceleration Of The Cycle Of Lust Mice ( *Rattus norvegicus* ) Femele Seen Based On The Thickness Of The Vaginal Epithelial and The Kornifikasi Of vaginal Epithelial Cells**

**ABSTRACT**

The estrus cycle is a process controlled by various hormones, either hormones of the hypothalamus-pituitary as well as from the ovaries. Estrogen can make cause a response to female activities such as: the development of secondary sexual behavior, the behavior of mating preparation (estrus), preparing the uterus for implantation and preparing the development of the mammary gland. The use of natural substances containing estrogen-like substances (*phytoestrogens / estrogen herbs*) is widely developed because it is believed to have no side effects, compared with estrogen synthesis or hormonal replacement therapy (HRT). The purpose of this research is to know the effect of the leaf water clover (*Marsilea crenata*) to the histothology of vaginal and the length of the cycle of lust which is seen based on the chromosomy of vaginal epithelial cells on female mice (*Rattus norvegicus*). Animal model using mice (*Rattus norvegicus*) female wistar strain and 2 months old with weight 100-150 grams. This research used 6 treatment groups that were positive control, negative control, group of mice that were given clover leaves water with concentration 20%, 40%, 60%, and 80% for 23 days. Quantitative of the data analysis using one way Analisis of Variance (ANOVA) and continued with Tukey test ( $\alpha = 5\%$ ). The thickness of the vaginal epithelial cell layer was observed quantitatively and the cordification of vaginal epithelial cells was observed through the vaginal swab. The results showed that the giving of the distilation of the leaf water clover was able to increase the thickness of the vaginal epithelial layer by 35.58% in the 80% treatment group.

Keywords: Leaf water clover, Estrus, Swab vaginal

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Reproduksi pada ternak memiliki proses yang rumit karena melibatkan banyak faktor. Ketidak munculannya salah satu atau lebih faktor dapat menimbulkan gangguan reproduksi. Pada hewan yang dewasa seksual dikenal adanya siklus reproduksi. Siklus reproduksi adalah siklus seksual yang terdapat pada individu betina dewasa seksual dan tidak bunting yang meliputi perubahan-perubahan siklik pada organ-organ reproduksi tertentu, seperti ovarium, uterus, dan vagina dibawah pengendalian hormon reproduksi. Interval timbulnya satu periode estrus kepermulaan periode estrus berikutnya dikenal sebagai siklus estrus. Interval-interval ini disertai oleh suatu perubahan-perubahan fisiologik di dalam saluran kelenjar betina (Taylor, 2004).

Siklus estrus merupakan proses yang dikendalikan oleh berbagai hormon, baik hormon dari Hipotalamus-hipofisis maupun dari ovarium. Perkembangan folikel dipicu oleh hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dari kelenjar hipofisis bagian anterior (Adenohipofisis). Folikel yang sedang berkembang akan mengeluarkan estrogen yang berperan dalam metabolisme tubuh. Estrogen dapat menambah sintesis dan ekskresi hormon pertumbuhan sehingga dapat merangsang pertumbuhan sel-sel dalam tubuh, mempercepat penambahan bobot badan, merangsang korteks kelenjar adrenal untuk lebih banyak meningkatkan metabolisme

protein karena retensi nitrogen meningkat. Estrogen dapat menimbulkan respon terhadap aktivitas betina seperti:

perkembangan sifat seks sekunder, perilaku persiapan kawin (estrus), mempersiapkan uterus untuk implantasi dan menyiapkan perkembangan kelenjar susu.

Estrogen juga mempunyai efek anabolik pada tulang dan kartilago sehingga menambah pertumbuhan tulang. Pada fase luteal selepitem dari vagina akan dikombinasikan oleh sel parabasilar, sedangkan memasuki fase estrus selepitem berubah menjadi superfisial dan sel tanduk yang menandakan hewan dalam keadaan puncak estrus (Seier *et al.*, 2001).

Penggunaan bahan alami yang mengandung *estrogen-like substances* (fitoestrogen/herbal estrogen) banyak dikembangkan karena diyakini tidak menimbulkan efek samping, dibandingkan dengan estrogen sintesis atau obat-obat hormonal pengganti (*hormonal replacement therapy/HRT*). Fitoestrogen merupakan suatu substrat dari tumbuhan yang memiliki aktivitas mirip estrogen. Fitoestrogen merupakan dekomposisi alami pada tumbuhan yang memiliki banyak kesamaan dengan estradiol, bentuk alami estrogen yang paling poten (Cassidy, 2005).

Kajian epidemiologi menyatakan bahwa konsumsi fitoestrogen dalam jumlah besar mampu menurunkan resiko beberapa penyakit seperti resiko kanker payudara, jantung koroner, osteoporosis dan angka kejadian *hot flushes* pada manusia. Penggunaan fitoestrogen pada ternak juga dimanfaatkan untuk memicu birahi. Kelompok fitoestrogen pada tanaman yakni; isoflavon, lignan, kumestan,

triterpen, glikosida, dan senyawa lain yang berefek estrogenik, seperti flavones, chalcones, diterpenoids, triterpenoids, coumarins dan acyclics. Isoflavon merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, karena kandungan fitoestrogen yang cukup tinggi. Isoflavon banyak ditemukan salah satunya pada tanaman semanggi air (Grady *et al.*, 2006).

Semanggi air mengandung minyak atsiri, coumarin, mineral, kalium, natrium, magnesium, kalsium, besi, kromium, zat rasa pahit, vellarine, dan isoflavone genestein. Semanggi air diduga dapat menyebabkan perubahan pada sistem reproduksi terutama pada hewan mamalia. Perubahan sistem reproduksi tersebut berupa perubahan uterus, ovarium, dan siklus birahi. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh perasan daun semanggi air terhadap perubahan histologi endometrium uterus dan vagina.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian perasan daun semanggi air dapat mempercepat siklus birahi tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina berdasarkan ketebalan lapisan sel epitel vagina?
2. Apakah perasan daun semanggi air dapat mempercepat siklus birahi tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina berdasarkan ulangan estrus.

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang diperoleh dari FMIPA Universitas Brawijaya Malang dengan umur 2 bulan dan berat rata-rata 100-150 gram (Harlan Laboratories, 2014).  
Penggunaan hewan coba telah mendapat sertifikat etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan No. 347/EC/KEPK/05/2015.
- 2) Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha diberikan pada hari pertama dengan dosis 0,1 mg/kg BB dengan volume pemberian sebanyak 0,2 ml melalui intra vena.
- 3) Daun Semanggi air didapat dari wilayah Sidoarjo yang telah dideterminasi dan sudah mendapat surat keterangan determinasi dari Materia Medica dengan No 074/441/101/8/2015. Dosis pemberian perasan daun semanggi air (*Marsilea crenata*) yang diberikan pada hewan coba per hari yaitu sebesar 2 cc yang masing-masing dosis diencerkan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan diberikan 1 kali sehari secara peroral dimulai pada hari ke-1 sampai pada hari ke-23 (Anggiani dan Adnyana, 2006).
- 4) *Etinilestradiol* diberikan untuk perlakuan kontrol positif pada hari kedua sampai hari ke 23 dengan dosis 0,00027 mg/kg BB dengan volume pemberian sebanyak 2 mL.
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ketebalan epitel vagina dari preparat histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) (Junqueira, 2007).

- 6) Variabel kornifikasi sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar diamati dengan pewarnaan *Methylen Blue* (Renita,2004).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui apakah pemberiandaun semanggi air berpengaruh terhadap percepatan siklus birahi tikusputih (*Rattus norvegicus*) betina berdasarkanketebalan lapisan selepitel vagina.
2. Mengetahui apakah pemberian daun semanggi air berpengaruh terhadap percepatan siklus birahi tikusputih (*Rattus norvegicus*) betina berdasarkan ulangan estrus.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini yakni:

Memberikan informasi tentang potensi perasan daun semanggi air terhadap siklus birahi tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dan sebagai dasar untuk penelitian berikutnya.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Semanggi Air (*Marsilea Crenata*)

Semanggi air merupakan tanaman dengan bentuk anak daun yang khas seperti jantung dengan daun yang majemuk. Semanggi air banyak tumbuh di saluran air dekat pematang sawah atau tanah-tanah becek. Kandungan mineral pada daun dan tangkai semanggi air adalah kalium, fosfor, besi, natrium, kalsium, seng, dan tembaga. Semanggi air juga memiliki kandungan fitokimia seperti alkaloid, steroid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi, dan asam amino. Kandungan mineral dan fitokimia yang berfungsi untuk melarutkan kristal kalsium oksalat ( $\text{CaOx}$ ) adalah kalium dan flavonoid (Nurjanah dan Abdullah, 2012).

Semanggi air merupakan tanaman air dari famili *marsileaceae* dan termasuk dalam kelas *filicinae*. Famili *marsileaceae* ini terdiri dari tiga genus dan 70 spesies. Famili *marsileaceae* tergolong paku air dan bersifat heterospora yakni memiliki makrospora dan mikrospora. Semanggi air biasanya tumbuh pada daerah dengan kondisi tanah yang lembab dan pada daerah berair. Dikatakan mirip dengan paku air karena tanaman memiliki sporangia yang merupakan perkembangan dari sporangiocap yang nantinya akan menghasilkan makrospora dan mikrospora (Hemming dkk, 2008).

Hasil uji penelitian yang didapat yaitu prosentase komposisi daun dan tangkai pada semanggi air terdiri atas, kadar air 89,02%, kadar abu 2,70%, kadar protein 4,35% dan kadar serat kasar 2,28%. Di Indonesia khususnya pulau jawa,

Filipina dan Thailand daun semanggi air yang masih muda digunakan sebagai sayuran. Di Filipina digunakan sebagai bahan obat sedangkan di India daun semanggi air digunakan untuk mengobati kusta, demam dan keracunan pada darah. Di Australia tanaman ini banyak digunakan sebagai tepung dan dimakan. Di *New Zeland* semanggi air digunakan sebagai tanaman hias pada akuarim (Hariana,2006).

*Isovlafone* adalah salah satu jenis fitoestrogen yang mempunyai struktur kimia serupa dengan estradiol. *Fitoestrogen* dapat berkaitan dengan reseptorspesifik,estrogen pada nukleus sel dan berdampak menyerupai respon hormon estrogen.Kandungan *isovlafone* banyak terdapat pada tanaman semanggi air.*Isovlafone* yang utama terkandung dalam semanggi air adalah *genistein* , *daidzein* dan *biochanin A*(Setchell,2001).

Manfaat daun semanggi air yang dibuktikan dengan penelitian pada hewan laboratorium dan perbandingan populasi penduduk Asia dan Eropa menunjukkan bahwa pola makan sangat berpengaruh dengan masalah kesehatan. Penduduk Asia mengonsumsi kacang-kacangan seperti kedelai dan sayuran seperti kemangi, touge dan semanggi air yang mengandung fitoestrogen dalam jumlah yang cukup banyak di bandingkan penduduk Eropa. Hal tersebut dibuktikan dengan suatu studi yang menyatakan bahwa penduduk Asia lebih rendah terserang kanker payudara, kanker endometrium, gejala monopous dan osteoporosis dibandingkan dengan penduduk Eropa. Penelitian tersebut membuktikan bahwa fitoestrogen yang terdapat pada daun semanggi air berfungsi untuk mencegah kanker payudara, kanker endometrium, gejala monopous dan osteoporosis (Adlercreutz *et al.*,2007).

## 2.2 Fitoestrogen

*Fitoestrogen* memiliki dua gugus hidroksil (OH) yang berjarak 11,0 – 11,5 Å pada intinya, sama persis dengan estrogen. Jarak 11 Å dan gugus OH inilah yang menjadi struktur pokok suatu substrat agar mempunyai efek estrogenik, sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen (Achadiat, 2003). Penelitian menggunakan mencit yang diovariectomi kemudian diberi fitoestrogen menunjukkan aktivitas proliferasi sel-sel endometrium (Haibinetal.,2005). Penelitian tersebut membuktikan kemampuan *fitoestrogen* untuk berikatan dengan reseptor estrogen pada jaringan. Namun, potensi *fitoestrogen* diketahui lebih kecil (0,01 – 0,001) dari potensi estrogen alami (Winarsi, 2005).

Struktur kimia *fitoestrogen* memiliki kemiripan dengan struktur kimia estrogen pada mammalia. Cincin fenolat pada *isoflavone* merupakan struktur penting pada sebagian besar komponen *isoflavone* yang berfungsi untuk berikatan dengan reseptorestrogen. Struktur equol apabila ditumpangkan pada struktur estrogen maka jarak antara gugus hidroksil keduanya sangat identik, oleh sebab itu *fitoestrogen* mampu berikatan dengan reseptor estrogen (RE). *Fitoestrogen* merupakan kompetitor aktif untuk reseptor estrogen, terutama reseptor  $\beta$  (Whittenet al.,2001).

Mekanisme kompetisi *fitoestrogen* terhadap estrogen endogen adalah dengan menghambat aktivitas enzim DNA isomerase II sehingga ekspresi protein dalam sel terhambat. Mekanisme tersebut juga terjadi dalam penghambatan *fitoestrogen* terhadap siklus sel (Prawiroharsono, 2001). *Fitoestrogen* juga

merupakan inhibitor bagi aromatase yang berperan dalam pembentukan estradiol. *Fitoestrogen* juga mempengaruhi ketersediaan estradiol dengan menghambat  $17\beta$  hidrosisteroid dehidrogenase I (Whittinet *al.*,2001). Namun, efek fitoestrogen bersifat bifasik terhadap sintesis DNA, yaitu pada konsentrasi 0,1 – 10  $\mu$ M dapat menginduksi sintesis DNA sedangkan pada konsentrasi 20 – 90  $\mu$ M bersifat menghambat sintesis DNA (Wanget *al.*, 2003).

### 2.2.1 Manfaat Fitoestrogen

*fitoestrogen* dapat mengurangi gejala *hot flushes* secara berkala, memperbaiki profil lipid/lemak dalam plasma, serta menghambat perkembangan aterosklerosis (sehingga mencegah penyakit kardiovaskular). Selain itu, *fitoestrogen* juga menghambat pertumbuhan sel-sel tumor/kanker mammae dan endometrium (selaput lendir rahim) (Barentsen,2004).

Paparan *fitoestrogen* dalam bentuk *isoflavon* terbukti mempengaruhi struktur organ reproduksi. Hasil penelitian Awoniyi *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa paparan genistein dengan dosis 50 mg/hari pada tikus sejak hari ke- 17 kebuntingan sampai berakhirnya masa laktasi (21 hari postpartum) dapat menurunkan berat ovarium dan uterus serta kadar estradiol dalam serum. Hal tersebut dapat terjadi karena dalam organ reproduksi memiliki reseptor estrogen.

*Fitoestrogen* adalah tumbuhan yang bersifat serupa hormon estrogen. Tumbuhan golongan *fitoestrogen* ini disamping banyaknya manfaat dalam penggunaannya juga tidak terlepas dari efek samping yang khususnya disebabkan oleh terganggunya sistem hormon endokrin dengan masuknya zat yang berikatan dengan hormon estrogen endogen. Sebagai contoh penggunaan Genistein pada masa

pra natal dilaporkan bersifat karsinogenik terhadap uterus dari tikus. Data pada hewan umumnya sangat tergantung pada waktu penggunaan, khususnya saat-saat bayi hewan yang dilahirkan dapat menimbulkan efek samping yang tidak dikehendaki. Masalah gangguan reproduksi juga banyak ditemukan pada pemeriksaan laboratorium dari binatang percobaan yang memakan tumbuhan golongan *fitoestrogen* dalam jumlah yang banyak (Helmut,2004).

*isoflavan* merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan, karena mengandung *fitoestrogen* yang cukup tinggi. Struktur kimia *fitoestrogen* memiliki kemiripan dengan struktur kimia estrogen pada mamalia. Fungsi utama estrogen adalah menifestasi tingkah laku saat kawin pada waktu estrus, perubahan-perubahan siklik pada alat reproduksi betina, perkembangan saluran pada kelenjar mammae, dan perkembangan sifat-sifat kelamin sekunder (Glover, 2006).

### **2.3 Tikus Putih (*Ratus norvegicus*)**

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow *et al.*,2006). Tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar lebih besar dari famili tikus umumnya dimana tikus ini dapat mencapai 40 cm diukur dari hidung sampai ujung ekor dan berat 140-500 gram. Tikus betina biasanya memiliki ukuran lebih kecil dari tikus jantan dan memiliki kematangan seksual pada umur empat bulan dan dapat hidup selama empat tahun (Kusumawati, 2004). *Rattus norvegicus* memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm (Myers and Armitage, 2004). Hewan

ini memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun,serta memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Epstein, 2004). Salah satu galur dari *Rattus norvegicus* yang banyak digunakan untuk penelitian adalah galur Wistar. Ciri-ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus berwarna merah dan berekor panjang (Sirois, 2005).

Tikus putih memiliki ekor bersisik dengan ukuran lebih pendek dibandingkan panjang badannya dan tubuhnya berukuran medium. Rambutnya sedikit kasar dan di bagian dorsal berwarna abu-abu serta di bagian ventral berwarna putih kekuningan (Suckow *et al.*, 2006). Jenis kelamin ditentukan dengan membandingkan celahanogenital melalui pengukuran jarak antara alat genital dengan anus dan ukuran tonjolan genital. Tikus jantan dicirikan dengan ukuran celah anogenital yang lebih panjang dan tonjolan genital yang lebih besar (Fox, 2002). Menurut Suckow *et al.*, (2006) klasifikasi taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah :

Kingdom	: Animalia
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>



**Gambar 2.1** Tikus *Rattus norvegicus* (Suckow, 2008)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar telah menjadi hewan coba untuk penelitian hormonal pada penelitian (Megawati dkk.,2005) yaitu “Siklus estrus dan struktur histologis ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian monosodium glutamat (MSG) secara oral”. Dalam penelitian tersebut digunakan 25 tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) betina yang belum pernah bunting, umur 2 bulan dan berat badan rata-rata 150 gram. Pakan hewan uji adalah pelet Br II dan air ledeng sebagai minumannya. Untuk pewarnaan preparat apus vagina digunakan larutan Methilen Blue 0,1%. Untuk pembuatan preparat awetan histologi ovarium diperlukan seperangkat bahan pembuatan preparat section dan zat warna Ehrlich Hematoxilin-Eosin. Pemilihan hewan coba ini dikarenakan sifatnya sebagai hewan cobamemilikikedekatan dengan manusia. Selain itu tikus putih merupakan hewanmamalia pemakan segala (omnivora) yang mudah berkembang biak, sistem fisiologisnya mirip dengan manusia, memiliki respon yang cepat, memberikan gambaran ilmiah yang mungkin terjadi dan mudah mendapat perlakuan. Tikus putih juga memiliki struktur esophagus yang langsung

bermuara ke lambung, sehingga tidak dapat memuntahkan makanannya dan tidak memiliki kantung empedu (myers,2004).

Perubahan pada sel epitel vagina saat estrus yaitu pada fase folikuler di dalam ovarium, estrogen merangsang sel epitel vagina aktif bermitosis dan mensintesis glikogen sehingga lapisan mukosa vagina menjadi lebih tebal menjelang ovulasi dan lumen vagina banyak mengandung glikogen. Penebalan epitel lapisan mukosa disertai dengan proses penandukan atau kornifikasi. Dengan ditemukannya sel epitel menanduk pada preparat apus vagina adalah indikator terjadinya ovulasi. Menjelang ovulasi leukosit makin banyak menerobos lapisan mukosa vagina kemudian ke lumen (Eddiman, 2013).

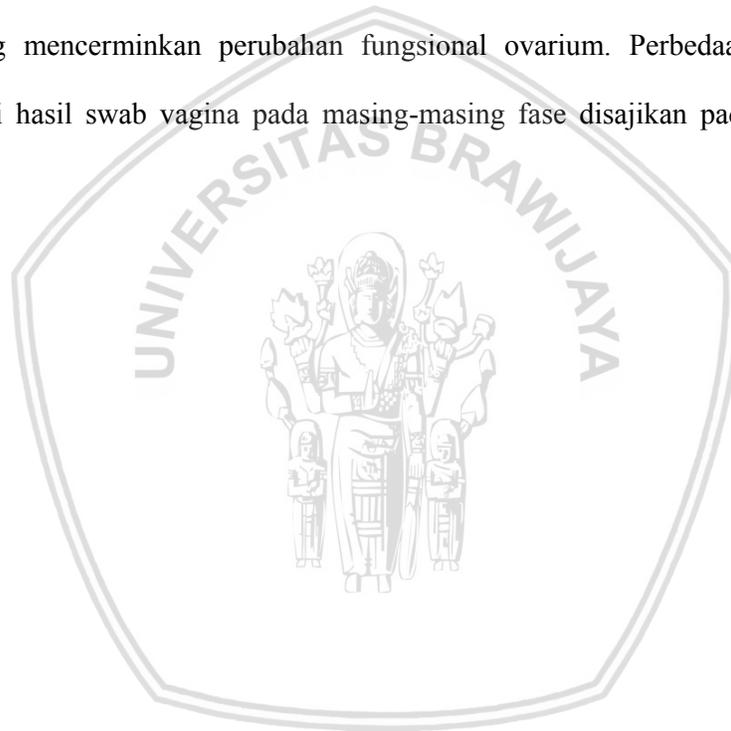
#### **2.4 Siklus Reproduksi Tikus Betina**

Siklus reproduksi disebut juga sebagai siklus estrus. Estrus atau birahi adalah suatu periode secara psikologis maupun fisiologis yang bersedia menerima pejantan untuk berkopulasi. Periode dari permulaan periode birahi ke periode birahi berikutnya disebut siklus estrus (Akbar, 2010).

Siklus estrus adalah siklus seksual pada mamalia bukan primata yang tidak menstruasi. Siklus estrus merupakan cerminan dari berbagai aktivitas yang saling berkaitan antara hipotalamus, hipofisis, dan ovarium. Selama siklus estrus terjadi berbagai perubahan baik pada organ reproduksi maupun pada perubahan tingkah laku seksual. Tikus termasuk hewan poliestrus. Artinya, dalam periode satu tahun terjadi siklus reproduksi yang berulang-ulang. Daur estrus jenis hewan ini dibedakan menjadi lima fase yaitu Proestrus, Estrus, Metestrus dan Diestrus. Siklus estrus tikus satu siklus bisa selesai dalam 6 hari. Meskipun pemilihan

waktu siklus dapat dipengaruhi oleh faktor- faktor eksteroseptif seperti cahaya, suhu, status nutrisi dan hubungan sosial (Akbar, 2010).

Setiap fase dari daur estrus dapat dikenali melalui pemeriksaan apus vagina. Apus vagina merupakan cara yang sampai kini dianggap relatif paling mudah dan murah untuk mempelajari kegiatan fungsional ovarium. Melalui apus vagina dapat dipelajari berbagai tingkat diferensiasi sel epitel vagina yang secara tidak langsung mencerminkan perubahan fungsional ovarium. Perbedaan gambaran histologi hasil swab vagina pada masing-masing fase disajikan pada Tabel 2.1 berikut.



**Tabel 2.1** Gambaran histologi epitel vagina (Zulfianti, 2003).

NO	SIKLUS	GAMBARAN
1.	Proestrus	<p>a) Jumlah sel epitel berinti dan sel leukosit berkurang, digantikan epitel bertanduk.</p> <p>b) Terdapat lendir yang banyak.</p> <p>c) Fase ini berlangsung 12 jam.</p> <p>Keterangan :</p> <p>a) Epitel berinti</p> <p>b) Sel leukosit</p> <p>c) Epitel bertanduk</p>
2.	Estrus	<p>a) Leukosit dan epitel berinti hilang.</p> <p>b) Terdapat epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan besar.</p> <p>c) Fase ini berlangsung 12 jam.</p> <p>Keterangan :</p> <p>a) Eptel bertanduk</p>
3.	Metestrus	<p>a) Terlihat epitel berinti dan leukosit.</p> <p>b) Epitel bertanduk berkurang.</p> <p>c) Fase ini berlangsung 21 jam.</p> <p>Keterangan :</p> <p>a) Epitel berinti</p> <p>b) Sel leukosit</p> <p>c) Epitel bertanduk</p>
4.	Diestrus	<p>a) Leukosit dan sel berinti tersebar homogen.</p> <p>b) Fase ini berlangsung 48 jam.</p> <p>Keterangan :</p> <p>a) Epitel berinti</p> <p>b) Sel leukosit</p>

Proestrus adalah fase sebelum estrus yaitu periode dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel de graaf dibawah pengaruhFSH. Fase ini berlangsung 12 jam. Setiap folikel mengalami pertumbuhan yang cepat selama 2-3 hari sebelum estrus sistem reproduksi memulai persiapan-persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium. Akibatnya sekresi estrogen dalam darah semakin meningkat sehingga akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan saraf, disertai kelakuan birahi pada hewan-hewan betina peliharaan. Perubahan fisiologis tersebut meliputi pertumbuhan folikel, meningkatnya pertumbuhan endometrium, uteri dan serviks serta peningkatan vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina pada beberapa spesies (Akbar, 2010).

Estrus adalah fase yang ditandai oleh penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk berkopulasi, fase ini berlangsung selama 12 jam. Folikel *de graaf* membesar dan menjadi matang serta ovum mengalami perubahan-perubahan kearah pematangan. Pada fase ini pengaruh kadar estrogen meningkat sehingga aktivitas hewan menjadi tinggi, telinganya selalu bergerak-gerak dan punggung lordosis. Ovulasi hanya terjadi pada fase ini dan terjadi menjelang akhir siklus estrus (Akbar, 2010).

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus di mana corpus luteum bertumbuh cepat dari sel granulose folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan *adenohypophysa*. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh corpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH oleh *adenohypophysa* sehingga menghambat pembentukan folikel de Graaf yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus uterus mengadakan

persiapan-persiapan seperlunya untuk menerima dan memberi makan pada embrio. Menjelang pertengahan sampai akhir metestrus, uterus menjadi sedikit lunak karena pengendoran otot uterus. Fase ini berlangsung selama 21 jam (Akbar, 2010).

Diestrus adalah periode terakhir dan terlama siklus birahi pada tikus dan mamalia. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum menjadi matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi nyata. Endometrium lebih menebal dan kelenjar-kelenjar berhypertrophy. Serviks menutup dan lendir vagina mulai kabur dan lengket. Selaput mukosa vagina pucat dan otot uterus mengendor. Pada akhir periode ini corpus luteum memperlihatkan perubahan-perubahan retrogresif dan vakuolisasi secara gradual. Endometrium dan kelenjar-kelenjarnya beratrofi atau beregresi ke ukuran semula. Mulai terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke proestrus (Akbar, 2010).

## **2.5 Organ Reproduksi Betina**

### **2.5.1 Ovarium**

Bentuk ovarium sangat bervariasi sesuai dengan spesies dan tergantung pada hewannya, apakah ia termasuk golongan politokus ataupun monotokus (hewan yang melahirkan lebih dari satu). Ovarium adalah kelenjar berbentuk biji, terletak di kanan dan kiri uterus di bawah tuba uterin dan terikat di sebelah belakang oleh mesovarium. Ovarium merupakan pabrik penghasil telur dan hormon kelamin yaitu estrogen dan progesteron. Ovarium tempat berkembangnya folikel telur, yaitu folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel de Graaf,

korpus rubrum, korpus luteum dan korpus albikan. Folikel telur adalah sel telur yang dilingkupi oleh sel-sel granulosa (sel folikel) dengan ketebalan lapisan yang bervariasi, sesuai dengan tingkat perkembangannya ( Akbar,2010).

### **2.5.2 Oviduk**

Saluran ini terdapat sepasang dan merupakan penghubung antara ovarium dengan uterus. Oviduk terdiri dari bagian interstisialis, bagian ismika, bagian ampularis dan infundibulum yang berfimbria. Oviduk berfungsi pada saat ovulasi dimana ovum disapu ke dalam ujung oviduk yang berfimbria. Fungsi lain dari oviduk adalah kapasitasi sperma, fertilisasi, dan pembelahan embrio yang terjadi dibagian ampula. Pengangkutan sperma ke tempat fertilisasi dan pengangkutan ovum ke uterus diatur oleh kontraksi muskuler yang dikoordinir oleh hormon ovarial, estrogen dan progesteron (Akbar, 2010).

### **2.5.3 Uterus**

Uterus adalah suatu struktur saluran muskuler yang diperlukan untuk penerimaan ovum yang dibuahi, penyediaan nutrisi danperlindungan fetus, serta stadium permulaan ekspulsi fetus padawaktu kelahiran.Dinding uterus terdiri dari 3 lapisan yaitu membran serosa(*Perimetrium*), merupakan lapisan terluar yang membungkus uterus yang terdiri dari jaringan ikat. Miometrium merupakan lapisan ke duayang terdiri dari otot polos yang mengandung pembuluh darah danlimpa. Sedangkan lapisan ketiga adalah endometrium merupakantempat nidasi atau implantasi serta perkembangan embrio bagi mencityang bunting. Bagi mencit yang tidak bunting endometriummerupakan selaput lendir yang mengandung kelenjar dan pembuluhdarah. Ketebalan selaput lendir dan vaskularisasi pada

endometrium bervariasi sesuai dengan perubahan-perubahan hormon ovarium yaitu estrogen, progesteron dan kehamilan (Darios *et all.*,2012).

#### **2.5.4 Serviks**

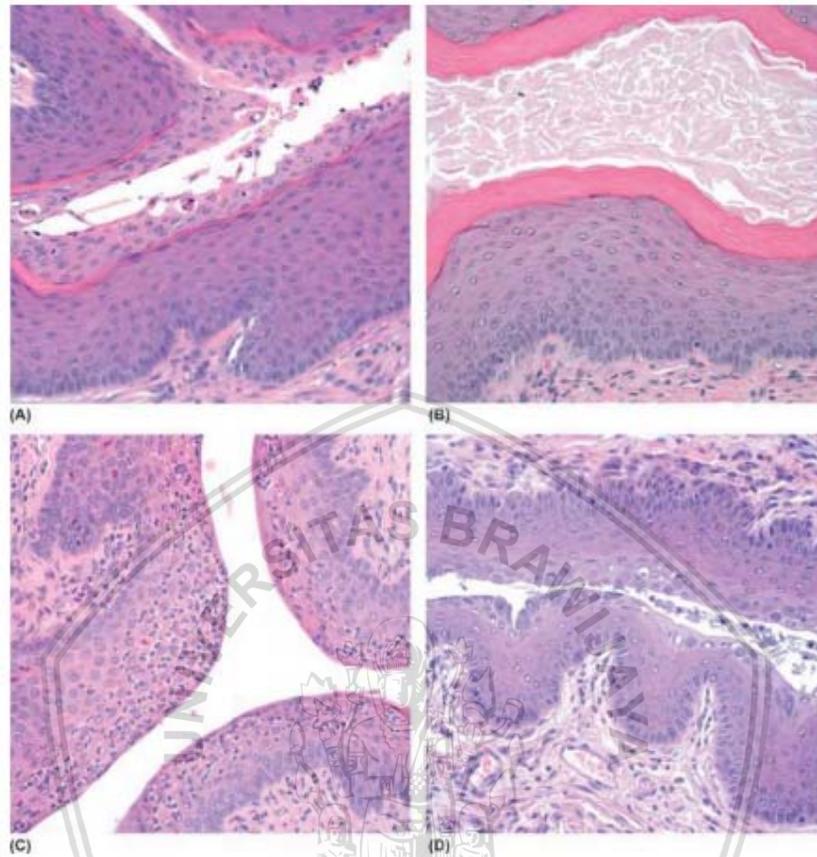
Serviks merupakan bagian bawah uterus yang menonjol ke dalam liang vagina sebagai porsio vaginalis dan menghubungkan organ ini ke vagina melalui kanalis servikalis. Dibagi atas porsio yang menonjol ke dalam vagina (porsio vaginalis) dan di atas vagina (porsio supravaginal). Kanalis servikalis yang bermuara ke dalam uterus adalah orifisium internum, dan yang bermuara ke dalam vagina adalah orifisium eksternum. Permukaan luar dari porsio vaginalis dikenal sebagai ekstoserviks dan porsio yang berhubungan dengan kanal endoservik adalah endoservik. Serviks mengandung banyak kelenjar bercabang dan kelenjar ini menampakkan perubahan aktivitas sekretoris selama fase estrus. Jumlah dan jenis mukus yang disekresi kelenjar-kelenjar servikal berubah selama siklus estrus karena dipengaruhi hormon ovarium yang berbeda (Bearden, 2008).

#### **2.5.5 Vagina**

Vagina terbagi menjadi dua bagian yaitu vestibulum (bagian luar vagina) dan vagina posterior (dari muara uterus sampai serviks). Dinding vagina terdiri dari mukosa, muscularis dan serosa. Pada betina yang memiliki siklus normal, sel-sel epithelium yang membatasi vagina mengalami perubahan secara periodik yang dikontrol oleh hormon yang disekresikan oleh ovarium. Vagina merupakan saluran panjang yang terletak dorsal terhadap urethra dan ventral terhadap rektum, sebagai tempat penumpahan semen dari individu jantan (Akbar, 2010).

Tikus yang sedang estrus akan terlihat adanya kongesti dan hyperemia dari vulva dan vagina, sehingga vulvanya terlihat merah. Sekresi lendir pada vagina bertambah selama birahi dengan konsistensi yang encer, karena banyaknya lendir pada vagina maka saluran vagina menjadi lebih mengkilat dan lebih licin (Adnan,2006).Estrogen berperan untuk merangsang pertumbuhan epitel vagina dan folikel ovarium sehingga menjadi matang dan siap untuk ovulasi. Folikel yang matang akan terus memproduksi estrogen, akibatnya estrogen dalam darah menjadi tinggi. Kadar estrogen yang tinggi dalam darah menandakan mencit sedang dalam fase estrus dan estrogen ini akan merangsang GnRH untuk memproduksi LH(Najamudin *et al.*, 2010).

Smear vagina merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi fase siklus estrus yang sedang dialami oleh individu betina. Setiap siklus estrus memiliki tipe sel yang berbeda. Perbedaan tipe sel ini dapat dijadikan petunjuk untuk mengetahui suatu fase estrus pada individu betina. Periode antara satu fase estrus dengan fase estrus berikutnya disebut siklus estrus. Setiap hewan memiliki siklus estrus yang berbeda-beda, ada golongan hewan monoestrus (estrus sekali dalam satu tahun), golongan poliestrus (estrus beberapa kali dalam setahun) dan hewan poliestrus bermusim (estrus hanya selama musim tertentu dalam satu tahun)(Nalbandov, 2010).



Gambar 2.2. Perubahan epitel vagina menciit selama siklus estrus. (A) proestrus, (B) Estrus, (C) metestrus, (D) Diestrus. (pewarnaan HE; perbesaran 400x) (Treuting *et al.*, 2012)

Morfologi mukosa vagina, terutama jumlah lapisan dan diferensiasi, perubahan selama siklus estrus. Secara histologis, empat tahap dari siklus estrus mudah ditentukan : proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. (A) selama proestrus, terdapat mukosa sekitar 10-13 sel tebal dan lapisan luar noda ringan dengan eosin, sedangkan lapisan granulosa menunjukkan peningkatan kornifikasi. Mitosis sering ditemukan, tetapi hanya sekitar leukosit yang tampak. (B) dalam siklus estrus, terdapat mukosa 12 sel tebal. Lapisan berinti dangkal hilang, dan lapisan cornified dangkal. Mitosis menuun, dan leukosit tidak ada. (C) Dalam

metestrus, lapisan cornified adalah delaminated, dan leukosit mulai muncul dibawah epitel. (D) selama diestrus, terdapat mukosa 4-7 sel tebal. Epitel permukaan yang mucified, dan lendir, leukosit serta desquamated sel yang ada (Suryanto, 2015).

### **2.5.6 *Esinilestradiol***

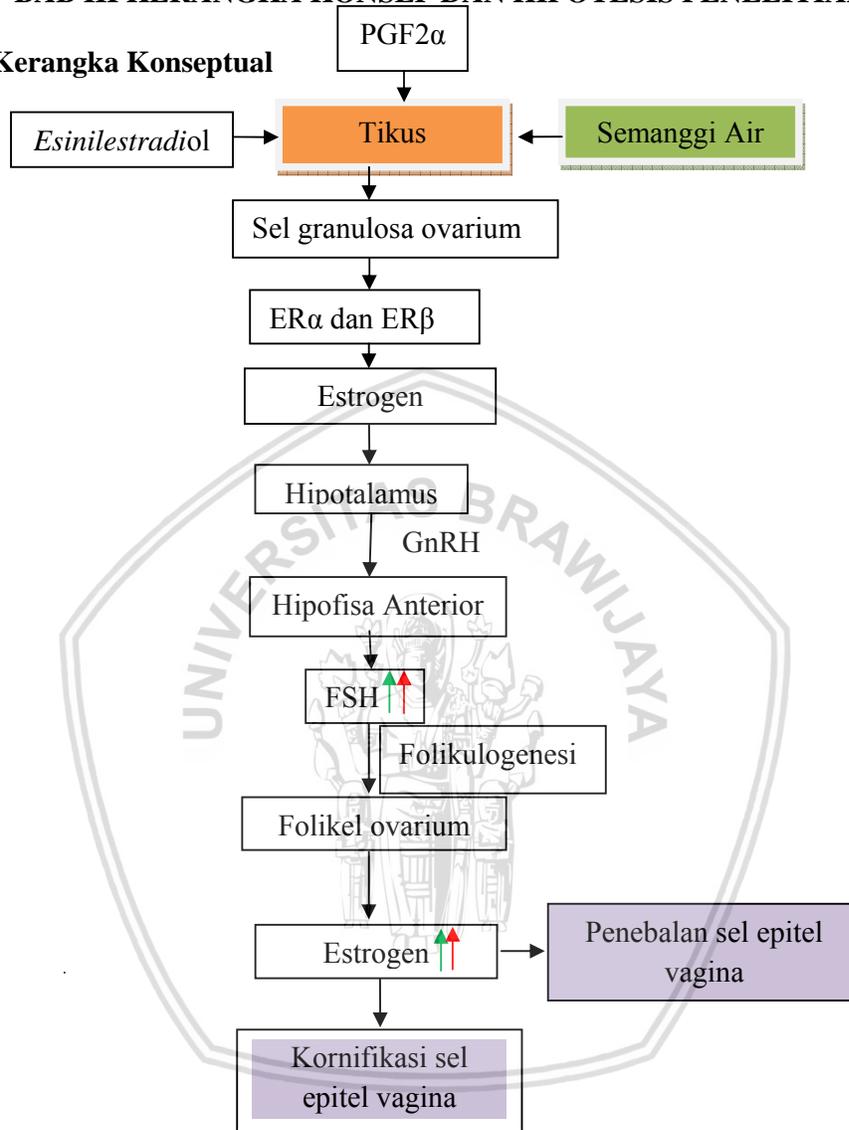
*Esinilestradiol* merupakan senyawa estrogen sintetik steroidal yaitu turunan sintetik dari estradiol alami. Sebagai turunan sintetik dari estradiol alami, *esiniestradiol* memacu pertumbuhan endometrium dan kornifikasi vagina. *Etiniestradiol* memnyebabkan pertumbuhan duktus kelenjar mammae, namun menghambat laktasi. *Esiniestradiol* juga menghambat sekresi hormon-hormon dari hipofisis anterior dan menyebabkan dilaktasi kapiler, retensi cairan dan anabolisme protein (Hartanto, 2002).

### **2.5.7 *Physiological Zouth***

*Physiological zouth* merupakan larutan yang bersifat isotonik. Larutan isotonik tubuh yang normal dan darah. Oleh karena itu sel darah merah tidak menjadi pecah atau lisis.

**BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 Kerangka Konseptual**



**Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian**

**Keterangan Gambar :**

-  : Variabel Bebas
-  : Variabel Kendali
-  : Variabel Terikat
-  : Efek perasan daun semanggi air
-  : Efek *Esinilestradiol*

Tikus diberikan  $PGF2\alpha$  yang bertujuan untuk sinkronisasi birahi, kemudian pada kontrol positif diberikan esinilestradiol yang merupakan estrogen sintesis. Pemberian esinilestradiol secara peroral dengan cara sonde lambung yang akan terserap oleh vili usus. Esinilestradiol akan masuk ke dalam sel granulosa ovarium yang mana di dalamnya terdapat 2 sub tipe dari reseptor estrogen yakni, estrogen reseptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) dan estrogen reseptor  $\beta$  ( $Er\beta$ ) yang menyebabkan banjir estrogen di ovarium, estrogen yang meningkat di ovarium menyebabkan feedback ke hipotalamus untuk menghasilkan GnRH yang menstimulasi hipofisis anterior untuk merangsang peningkatan FSH. Peningkatan FSH akan menyebabkan terjadinya folikulogenesis dan menghasilkan folikel de Graaf yang menyebabkan peningkatan estrogen dalam jumlah tinggi sehingga menyebabkan terjadinya penipisan epitel vagina dan kornifikasi epitel vagina.

Pemberian perasan daun semanggi pada perlakuan I, II, III dan IV yang mengandung isoflavon secara peroral dengan cara sonde lambung yang akan terserap oleh vili usus. Fitoestrogen akan masuk ke dalam sel granulosa ovarium yang mana di dalamnya terdapat 2 sub tipe dari reseptor estrogen yakni, estrogen reseptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) dan estrogen reseptor  $\beta$  ( $Er\beta$ ) yang menyebabkan banjir estrogen di ovarium, estrogen yang meningkat di ovarium menyebabkan feedback ke hipotalamus untuk menghasilkan GnRH yang menstimulasi hipofisis anterior untuk merangsang peningkatan FSH. Peningkatan FSH akan menyebabkan terjadinya folikulogenesis dan menghasilkan folikel de Graaf yang menyebabkan peningkatan estrogen

dalam jumlah tinggi sehingga menyebabkan terjadinya penipisan epitel vagina dan kornifikasi sel epitel vagina. Pemberian perasan daun semanggi air diharapkan bisa memberikan efek yang serupa dengan esinilestradiol. Isovalon yang mempunyai struktur mirip dengan hormon estrogen dapat berikatan dengan ER $\alpha$  dan ER $\beta$  namun ER $\beta$  lebih banyak jumlahnya di ovarium dan paling mudah berikatan dengan fitoestrogen. Fitoestrogen yang telah menjadi aktif karena berikatan dengan reseptor estrogen dibawa oleh sirkulasi darah menuju hipotalamus sehingga kadar estrogen dalam darah meningkat. Pada hewan betina, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) disekresikan dari hipotalamus merangsang pelepasan lutenising hormone (LH) dan follicle stimulating hormone (FSH) dari hipofisa anterior. FSH dan LH disekresikan dengan taraf yang berbeda pada periode siklus estrus. Pada awal siklus (fase follicular), FSH merangsang perkembangan folikel- folikel, salah satu diantaranya berkembang cepat menjadi folikel de Graff (GF). Folikel de Graff selanjutnya akan mensekresikan hormon estrogen.

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Perasan daun semanggi air (*Marsilea crenata*) berpengaruh terhadap percepatan siklus birahi berdasarkan ketebalan lapisan sel epitel vagina dan ualangan estrus pada tikus putih *Rattus norvegicus* betina

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 1 April 2015 sampai dengan 24 April. Penelitian dilakukan dikandang hewan percobaan Fakultas Kedokteran, Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus Norvergicus*) galur *Wistar* berjenis kelamin betina dan berumur 2 bulan dengan bobot 100-150 gram. Tikus diperoleh dari FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Menurut Kusriningrum (2008), estimasi besaran sampel dihitung berdasarkan rumus dibawah ini.

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

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 (4)$$

$$n =$$

Keterangan :

t = Jumlah Kelompok Perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Dari perhitungan diatas, maka untuk 6 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah hewan coba yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan dsain *post test only control group* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu :

Kelompok	Keterangan
Kontrol Positif	Kelompok pemberian <i>Etinilestradiol</i>
Kontrol Negatif	Kelompok tanpa perlakuan
Perlakuan I	Kelompok pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 20%
Perlakuan II	Kelompok pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 40%
Perlakuan III	Kelompok pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 60%
Perlakuan IV	Kelompok pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 80%

### 4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : variasi dosis daun semanggi air, Larutan *Physiological zouth, Esinilestradiol* dan *PGF2 $\alpha$*
- Variabel kendali : homogenitas jenis kelamin, umur, berat badan tikus dan lingkungan
- Variabel tergantung : histologi vagina dan kornifikasi sel epitel vagina

### 4.5 Materi Penelitian

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina dari spesies *Ratus norvergicus* berumur 2 bulan dengan bobot 100-150 gram. Bahan yang digunakan adalah Perasan daun semanggi air dengan konsentrasi 20%, 40% , 60%, dan 80%. Larutan PZ , *Mycrogyon*, NaCl fisiologi, *Pgf2 $\alpha$* .

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cotton bud*, objek *glass*, mikroskop, mikropipet, spuit 100 IU, *spuit* 3 mL, *dissecting set*, sarung tangan, masker, *refrigerator*, botol kecil, sonde tikus, tabung *ependoft*, kandang, pakan dan air untuk minum setiap hari.

#### 4.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri atas beberapa prosedur penelitian yang meliputi :

##### 4.6.1 Adaptasi Hewan Coba

Adaptasi di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilakukan terhadap 24 ekor tikus betina (*Rattus norvegicus*) strain wistar sebagai hewan coba, diperoleh dari daerah FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba sebelumnya diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan diri dengan kondisi di laboratorium. Hewan diberi pakan berupa ransum basah yang komposisinya disusun berdasarkan standar *Association of Official Analytical Chemist (AOAC)* (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air. Kandang tikus berukuran 35 x 30 x 20 cm dengan lantai kandang yang mudah dibersihkan dan sanitasi. Lokasi kandang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 24-25°C dan kelembapan udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Adaptasi pada hari pertama diberikan PGF2 $\alpha$  yang bertujuan untuk sinkronisasi birahi.

#### 4.6.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus diberikan PGF2 $\alpha$  pada hari awal penelitian yang berfungsi untuk sinkronisasi birahi, pemberian PGF2 $\alpha$  diberikan secara intra vena (IV) dengan dosis pemberian 2 mg/kg BB yang berfungsi untuk melisiskan corpus luteum. Berdasarkan perhitungan jumlah pengulangan, maka untuk enam macam perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam satu kelompok sehingga dibutuhkan 24 hewan coba.

#### 4.6.3 Metode Swab Vagina (*Vagina Smear*)

Kelebihan metode swab vagina adalah dapat menunjukkan hasil yang akurat terkait kondisi sitology vagina pada mencit dalam siklus estrus. Kekurangannya adalah masih sukarnya membedakan perbedaan sitology tahapan yang sedang dialami oleh tikus. Tahap-tahap dalam melakukan swab vagina adalah sebagai berikut (Byers, 2012) :

1. Mencit betina yang akan diperiksa dipegang dengan tangan kanan, dengan cara menelentangkannya diatas telapak tangan sementara tengkuk dijepit antara telapak tangan dan jari kelingking.
2. Ujung *cotton bud* dibasahi dengan larutan NaCl 0,9% kemudian secara perlahan dimasukan kedalam vagina mencit sedalam  $\pm$  5 mm dan diputar secara perlahan-lahan dua hingga tiga kali.
3. *Objek glass* dibersihkan dengan alkohol 70% dan dikering udarakan. Ujung *cotton bud* yang sudah diolekan pada vagina tersebut diolekan memanjang dua atau tiga baris olesan dengan arah yang sama pada gelas objek.

4. Olesan vagina tersebut ditetesi dengan larutan *methylen blue* 1% sambil sesekali dimiringkan agar pewarnaan merata pada permukaan ulasan dan ditunggu kurang lebih 5 menit. Pewarna yang berlebihan dibersihkan dengan membilas menggunakan akuades atau air mengalir kemudian ditutup dengan gelas penutup.

#### 4.6.4 Pembuatan Perasan

Cara membuat konsentrasi air perasan daun semanggi air pada penelitian ini berdasarkan penelitian yang dilakukan (Yulia Anggiani dan I.D.P Anom Adnyana, 2006) adalah dengan cara sebagai berikut :

- a.) Daun Semanggi sebanyak 7 kg digunakan untuk pembuatan perasan dibersihkan dan dimasukkan kedalam katntong plastik steril kemudian dengan bantuan alat penggiling daun semanggi dihaluskan.
- b.) Setelah daun halus, yang ditampung dalam plastik steril, kemudian daun yang halus diperas dengan menggunakan kertas saring untuk mendapatkan air perasan daun semanggi dan ditampung dalam wadah yang steril.
- c.) Air perasan yang telah ditampung kemudian digunakan untuk pembuatan konsentrasi yang digunakan sebagai perlakuan dalam penelitian ini.
- d.) Air perasan yang didapatkan kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm dalam waktu 5 menit untuk mendapatkan hasil perasan murni dari daun semanggi
- e.) Pembuatan konsentrasi dengan menggunakan 2 buah tabung reaksi, semua konsentrasi dibuat dengan volume masing-masing sebanyak 200

mL sebagai larutan induk yang didapatkan dari hasil sentrifugasi. Cara pembuatan konsentrasi sebagai berikut :

1. Konsentrasi 100% : air perasan murni sebanyak 200 ml
2. Konsentrasi 80% : 40 ml akuades steril + 160 mL perasan
3. Konsentrasi 60% : 80 ml akuades steril + 120 mL air perasan
4. Konsentrasi 40% : 120 ml akuades steril + 80 mL air perasan
5. Konsentrasi 20% : 160 ml akuades steril + 40 mL air perasan

#### 4.6.5 Perlakuan hewan coba

Hewan coba sebanyak 24 ekor tikus betina dibagi dalam 4 jenis perlakuan dan 2 kontrol, dengan perhitungan setiap kelompok perlakuan kontrol terdiri dari 4 ekor.

Perlakuan terdiri atas 4 tingkatan dosis perasan daun semanggi :

- a.) Perlakuan I : pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 20%
  - b.) Perlakuan II : pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 40%
  - c.) Perlakuan III : pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 60%
  - d.) Perlakuan IV : pemberian perasan daun semanggi konsentrasi 80%
  - e.) Kontrol negatif : Tanpa perlakuan
  - f.) Kontrol positif : pemberian larutan *Ethinilestradiol*
1. Masing-masing hewan coba diberi perasan daun semanggi pada kelompok perlakuan I, II, III, IV, larutan *Ethinilestradiol* pada kelompok perlakuan kontrol positif dan larutan PZ pada kelompok perlakuan kontrol negatif dengan volume pemberian sebanyak 2 cc.

2. Perlakuan penyondean dilakukan satu kali pada pagi hari (pukul 08.00) sampai hari terakhir penelitian.
3. Perlakuan swab vagina dilakukan satu kali pada pagi hari (pukul 05.00) sampai hari terakhir penelitian.

#### **4.6.6 Pemberian *Etinilestradiol***

Perlakuan kontrol positif pada penelitian ini adalah pemberian sediaan larutan *Etinilestradiol* dengan dosis 0,00027 mg/kg BB yang diberikan dengan cara peroral menggunakan sonde lambung. Volume yang diberikan yaitu sebanyak 2 ml perhari. Pemberian *Etinilestradiol* bertujuan untuk kontrol positif karena *Etinilestradiol* merupakan estrogen sintetik (De Rensis *et al.*, 2007)

#### **4.6.7 Metode Eutanasi**

Metode euthanasia hewan coba dilakukan dengan metode dianastesi dengan ketamin melalui *intra muscular* dengan dosis 0,05 mL/kg BB dengan volume pemberian 0,1 mL/kg BB. Pemberian ketamin bertujuan untuk mengurangi rasa sakit dan agar tikus tersebut tidak depresi karena ketamin memiliki efek analgesik, sedasi, amnesia dan halusinasi.

#### **4.6.8 Pembuatan prepat swab vagina**

Pembuatan prepat swab vagina dilakukan dengan jalan mengambil sampel vagina tikus (perlakuan dan percobaan) dengan menggunakan *cotton bud* yang terlebih dahulu dibasahi dengan larutan NaCl fisiologis kemudian dibuat ulasan tipis di atas *objek glass*. Fiksasi *objek glass* lalu diberi pewarnaan menggunakan methylen blue selama 5 menit kemudian cuci *obyek glass* menggunakan air mengalir.

Preparat swab vagina diamati dengan menggunakan mikroskop *Olympus BX51* perbesaran 40x. Pemeriksaan preparat swab vagina bertujuan untuk memeriksa siklus birahi apakah menjadi lebih panjang atau lebih pendek siklusnya, berikut adalah fase pada siklus birahi:

**Tabel 4.3** Siklus birahi tikus betina

Gambaran histologi proestrus			1) Jumlah sel epitel berinti dan sel leukosit berkurang digantikan dengan epitel bertanduk 2) terdapat lendir yang banyak 3) fase ini berlangsung selama 12 jam
Gambaran histologi estrus	histologi	fase	1) Leukosit dan epitel berinti hilang 2) terdapat epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan besar 3) fase ini berlangsung selama 12 jam.
Gambaran histologi metestrus	histologi	fase	1) Terlihat epitel berinti dan leukosit, epitel bertanduk berkurang 2) fase ini berlangsung selama 21 jam
Gambaran histologi diestrus	histologi	fase	1) Leukosit dan sel berinti tersebar homogen dan fase ini berlangsung selama 48 jam

#### 4.6.7 Pembuatan preparat histologi

Pembuatan preparat histologi vagina didasarkan atas perlakuan terhadap tikus yang telah dilakukan. Pembuatan preparat dimulai dengan pembedahan tikus kontrol negatif (-), kontrol positif (+), kelompok pemberian perasan daun semanggi 20%, 40%, 60%, dan 80% yang dilakukan pada hari ke-25. Pembuatan preparat histologi vagina dilakukan setelah euthanasia hewan coba. Selanjutnya dilakukan pembedahan guna mengambil organ vagina di daerah posterior tubuh.

Vagina yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam cairan buffer formalin 10% untuk dibuat preparat histologis. Proses pembuatan preparat histologi

menurut Jungquiera dan Carnaero (2007) meliputi fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*). Infiltrasi parafin, *sectioning*, *embedding*, penempelan di gelas obyek, dan pewarnaan.

Langkah pertama pembuatan preparat histologi adalah fiksasi yaitu perendaman jaringan vagina dalam larutan PFA 4% (1-7 hari). Jaringan vagina dilanjutkan tanpa tahapan dehidrasi dengan cara direndam ke dalam etanol 70% minimal 24 jam dan etanol 80% selama 2 jam. Jaringan vagina direndam ke dalam etanol 90% dan 95% selama berurutan masing-masing 30 menit. Dilanjutkan perendaman 3 kali dalam *ethanol absolut* selama 30 menit.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan (*clearing*) dengan cara jaringan vagina dari etanol absolut ke dalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit) dan xylol II (20 menit). Proses selanjutnya dilakukan di dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Kemudian direndam ke dalam xylol sebanyak tiga kali. Jaringan vagina dicelupkan ke dalam parafin cair panas dan ditunggu beberapa saat agar jaringan vagina terikat dalam parafin blok.

Tahapan selanjutnya adalah *sectioning* dengan memindahkan parafin blok yang berisi jaringan vagina ke dalam penjepit mikrotom dan diatur kesejajaran permukaan kemudian dipotong dengan pisau mikrotom. Jaringan vagina diiris dengan ukuran 5µm. Hasil irisan dipindahkan menggunakan kuas ke dalam air hangat dengan suhu 38-40°C untuk menghilangkan kerutan halus pada preparat. Irisan yang sudah terbentuk dilakukan *embedding* dengan cara menempelkan hasil potongan jaringan vagina ke dalam objek gelas. Potongan tersebut

dikeringkan diatas hotplate 38-40°C sampai kering dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C dan siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Ramos, 2005).

#### 4.6.8 Pewarnaan Menggunakan Hematoxyline-Eosin

Pewarnaan preparat menggunakan *Hematoxy-Eosin* untuk mewarnai jaringan yang dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining hematoxylin*, digunakan untuk mengecat sitoplasma sel dan jaringan penyambung serta memberikan warna merah muda. Tahapan pewarnaan diawali dengan deparafinisasi dengan cara preparat dimasukan pada xylol bertingkat selama 5 menit. Selanjutnya pada tahap dehidrasi preparat dimasukan kedalam etanol absolut, etanol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam akuades selama 5 menit.

Pewarna dimasukan kedalam zat pewarna Hematoxylen selama 10 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan akuades. Setelah dibilas preparat dimasukan ke dalam eosin alkohol selama 10 menit. Tahap berikutnya adalah dehidrasi dengan memasukan preparat pada seri etanol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95%, dan etanol absolut. Selanjunya *clearing* dengan cara preparat dimasukan kedalam xylol dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan mounting dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan preparat dilakukan dengan menggunakan mikroskopperbesaran 400x pada bagian lapisanselepitel vaginayang diukur menggunakan OlyVIA (Ramos, 2005).

#### 4.6.9 Analisa Data

Data penelitian berupa tebal lapisan epitel vagina yang berasal dari pengukuran menggunakan aplikasi OlyVIA. Selanjutnya dilakukan analisa Statistik *One Way Analysis of varians* (ANOVA). Kemudian untuk mengetahui apakah ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau Tukey Test dengan tingkat signifikansi  $\alpha = 5\%$  menggunakan *Microsoft Office Excel* dan *Statistical Package for The Social Science* (SPSS) version 16.0 *for windows*. Sementara hasil pengamatan kornifikasi sel epitel vagina dianalisis secara kualitatif deskriptif (Candiasa, 2003).

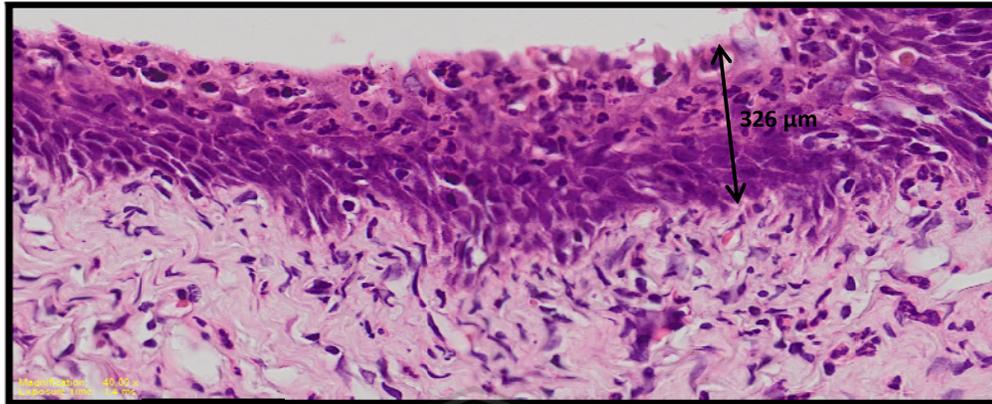
## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh Pemberian Perasan Daun Semanggi Air (*Marselia Crenata*) Terhadap Ketebalan Lapisan Sel Epitel Vagina Tikus putih (*Rattus norvegicus*) Betina

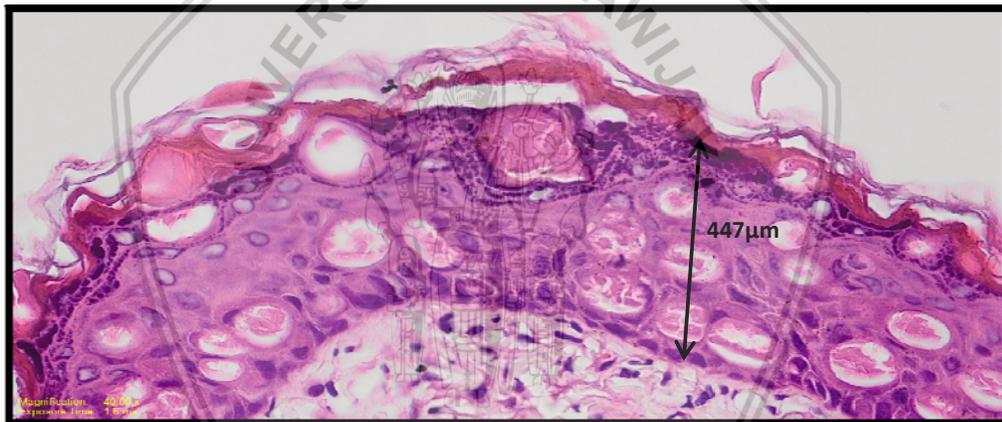
Hormon estrogen terutama dihasilkan oleh ovarium pada sel teka dan sel granulosa, sedikit oleh korpus luteum, plasenta, korteks adrenal dan testis. Estrogen bekerja pada organ target yaitu ovarium, vagina dan uterus. Pengaruhnya yang jelas adalah langsung terhadap pertumbuhan dan aktivitas glandula mammae dan endometrium. Estrogen terdapat dalam bentuk estradiol, estron, dan estriol. Potensi estrogenik estradiol adalah 12 kali kekuatan estron dan 80 kali lebih besar daripada estriol, sehingga estradiol dianggap sebagai estrogen utama. Hormon yang paling dominan yaitu estradiol-17 $\beta$  karena jumlahnya paling banyak terdapat dalam tubuh dan aktivitasnya paling tinggi (Cao *et al.* 2004).

Dalam ovarium, asetat akan diubah menjadi kolesterol dan melalui reaksi enzimatik, kolesterol diubah menjadi hormon steroid. Pembentukan estrogen di folikel ovarium dipengaruhi oleh hormon FSH. Estrogen dapat terbentuk dari androstenedion maupun testosteron. Biosintesis estrogen melibatkan hidroksilasi dari prekursor androgen yang dimediasi oleh kompleks enzim yang dikenal sebagai aromatase (Favaro,2007).

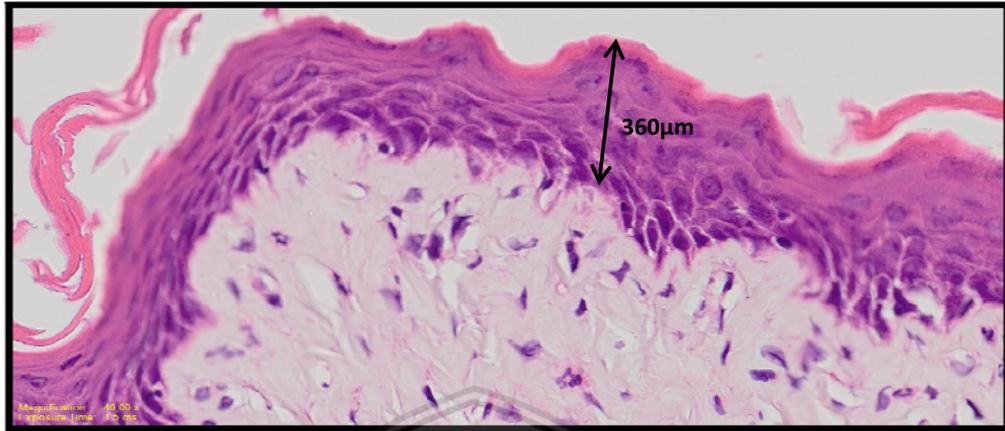
Gambaran histologi vagina dapat dilihat pada **Gambar 5.1**



**Gambar 5.1** Histologi lapisan sel epitel vagina kontrol negatif tikus tanpa perlakuan perbesaran 400x  
Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 326μm

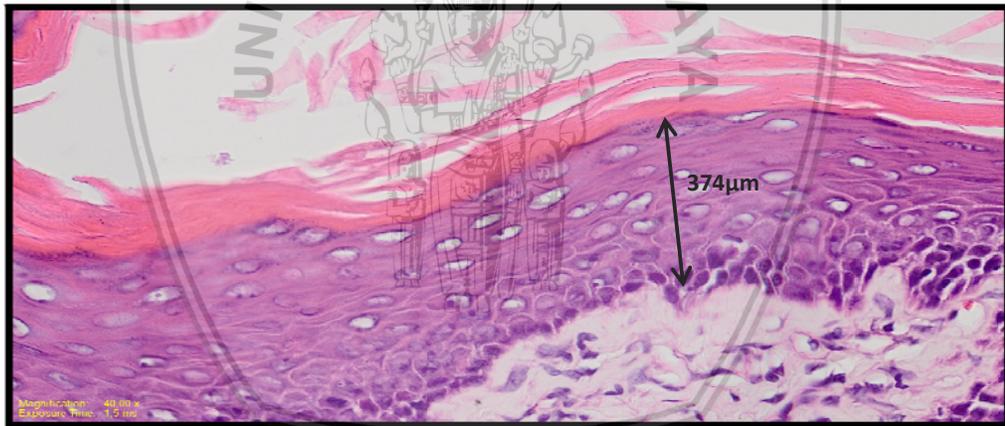


**Gambar 5.2** Histologi lapisan sel epitel vagina kontrol positif tikus dengan pemberian esinilestradiol secara peroral perbesaran 400x  
Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 447μm



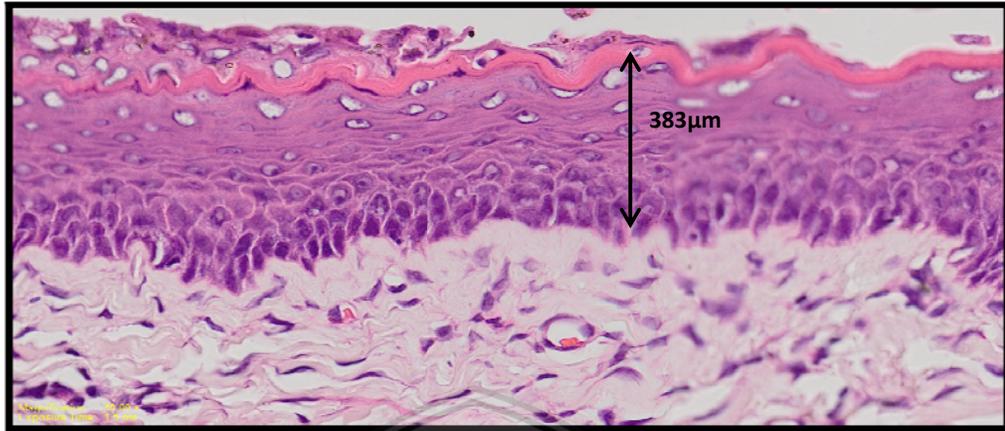
**Gambar 5.3** Histologi lapisan sel epitel vagina pada perlakuan (I) tikus dengan pemberian perasan daun semanggi air konsentrasi 20% perbesaran 400x

Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 360 $\mu$ m



**Gambar 5.4** Histologi lapisan sel epitel vagina perlakuan (II) tikus dengan pemberian perasan daun semanggi air konsentrasi 40% perbesaran 400x

Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 374 $\mu$ m



**Gambar 5.5** Histologi lapisan sel epitel vagina perlakuan (III)tikus dengan pemberian perasan daun semanggi air konsentrasi 60% perbesaran 400x

Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 383μm



**Gambar 5.6** Histologi lapisan sel epitel vagina perlakuan (IV) tikus dengan pemberian perasan daun semanggi air konsentrasi 80% perbesaran 400x

Keterangan : Ketebalan lapisan sel epitel vagina 442μm

Hasil pengukuran ketebalan epitel vagina dengan menggunakan *olyviadi* ditunjukkan dengan **Tabel 5.1**

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Ketebalan Lapisan Sel Epitel vagina**

Kelompok Tikus	Rata-rata ketebalan lapisan sel epitel vagina ( $\mu\text{m}$ )
Kontrol Negatif	$326 \pm 2,3^a$
Kontrol Positif	$447 \pm 2,9^c$
Perlakuan 20 %	$360 \pm 2,7^b$
Perlakuan 40 %	$374 \pm 2,6^c$
Perlakuan 60 %	$383 \pm 2,4^d$
Perlakuan 80 %	$442 \pm 3,4^e$

Keterangan : notasi a, b,c,d dan e menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Data pengukuran ketebalan lapisan epitel vagina kelompok kontrol negatif pada Tabel 5.1 dijadikan sebagai ketebalan lapisan epitel pada kondisi normal tikus model dan dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang nyata terhadap kelompok kontrol positif (dilihat dari notasi yang berbeda). Terjadi peningkatan secara signifikan pada kelompok kontrol positif sebesar 37,11% dari kelompok kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian *Esinilestradiol* mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina.

Berdasarkan **Tabel 5.1** dapat dilihat bahwa pada kelompok tikus yang diberi perasan daun semanggi air dengan konsentrasi 20% berbeda signifikan dengan kontrol negatif dan positif, namun mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina sebesar 10,43% dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok tikus yang diberi perasan daun semanggi air dengan konsentrasi 40 % berbeda signifikan dengan kontrol negatif dan positif, namun mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina sebesar 20,34% dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok tikus yang diberi perasan daun semanggi air

dengan konsentrasi 60 % berbeda signifikan dengan kontrol negatif dan positif, namun mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina sebesar 17,48% dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa perasan daun semanggi air dengan konsentrasi 20%, 40% dan 60% mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina namun belum optimal.

Pada kontrol (-) tidak diberikan perlakuan apapun, ditunjukkan dengan aktifitas estrogen melalui poliferasi mukosa vagina. Berdasarkan hasil pengukuran rata-rata ketebalan vagina diperoleh hasil  $326 \pm 2,3 \mu\text{m}$ . Kontrol negatif digunakan sebagai pembanding kelompok kontrol (+), P(1), P(2), P(3) dan P(4) untuk menentukan peningkatan ketebalan lapisan sel epitel vagina. Peningkatan kadar hormon estrogen pada tikus betina setelah pemberian perasan daun semanggi air, pada gambaran apusan vagina terdapat berbagai jenis sel. Pada fase proestrus terdapat sel epitel berinti dan sedikit epitel kornifikasi. Fase estrus terdapat sel epitel terkornifikasi dan fase metestrus terdapat sel epitel kornifikasi, sel epitel berinti dan leukosit. Menurut Junqueira (2007) sel epitel berinti berasal dari sel-sel epitel intermediet, sel epitel terkornifikasi berasal dari sel epitel superfisial dan leukosit berasal dari sel parabasal. Sel parabasa, sel intermediet dan sel superfisial merupakan sel yang berada di epitel vagina dan proliferasinya dipengaruhi oleh kadar hormon estrogen dalam tubuh.

Pada kontrol (+) diberikan *esinilestradiol* yang merupakan estrogen sintesis yang berperan untuk merangsang pertumbuhan epitel vagina dan folikel ovarium sehingga menjadi matang dan siap untuk ovulasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Ismudiono (2001) yang menunjukkan bahwa pemberian *esiniestradiol*

akan mempercepat pematangan folikel sehingga produksi estrogen mengalami peningkatan, akibatnya estrogen dalam darah menjadi tinggi. Kadar estrogen yang tinggi dalam darah menandakan tikus sedang dalam fase estrus. Estrogen menyebabkan proliferasi mukosa vagina, permukaan vagina yang basah, merah dan sel epitel mengalami penandukan.

Kelompok tikus yang diberi perasan daun semanggi air dengan konsentrasi 80 % berbeda signifikan dengan kontrol negatif namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. Terjadi peningkatan sebesar 35,58% dibandingkan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa perasan daun semanggi air 80 % mampu meningkatkan ketebalan lapisan sel epitel vagina dengan optimal karena daun semanggi air mengandung fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan *estrogen-like substances*, memiliki rumus bangun kimia sangat berbeda dengan estrogen namun efeknya sangat mirip dengan estrogen. Khasiat estrogenik dapat terjadi karena fitoestrogen juga memiliki dua gugus OH/hidroksil yang berjarak 11-15 Angstrom pada intinya sama persis dengan inti estrogen (Tapan, 2003). Fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen yang diproduksi oleh tubuh. Fitoestrogen yang terkandung pada jaringan tanaman adalah glikosida yang larut dalam air, pada level yang tinggi dalam darah fitoestrogen dapat menghalangi pelepasan hormon gonadotropin dari hipofisa dan akan bersaing dengan estrogen endogen untuk menempati reseptor pada jaringan target seperti uterus, serviks dan vagina (Widodo, 2005).

## 5.2 Pengaruh Pemberian Perasan Daun Semanggi Air (*Marselia Crenata*) Terhadap Ulangan Estrus tikus (*Rattus norvegicus*) Betina

Pengukuran rata-rata pengulangan estrustikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang dilakukan dengan mengamati tingkah laku estrus hewan coba selama 23 hari masa perlakuan. Data dianalisis menggunakan ANOVA dan menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ), selanjutnya dilakukan uji lanjutan menggunakan BNJ dan didapatkan hasil yang dapat dilihat pada **Tabel 5.2**

**Tabel 5.2 Rata-Rata Ulangan Estrus**

Kelompok Tikus	Rata-rata ulangan estrus
Kontrol Negatif	4,25 ± 0,5 <sup>a</sup>
Kontrol Positif	5,75 ± 0,5 <sup>b</sup>
Perlakuan 20 %	5 ± 0,81 <sup>a</sup>
Perlakuan 40 %	5,25 ± 0,5 <sup>a</sup>
Perlakuan 60 %	5,5 ± 0,57 <sup>a</sup>
Perlakuan 80 %	5,7 ± 0,5 <sup>b</sup>

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan analisis diatas pada **Tabel 5.2** kelompok K+ memiliki rata-rata ulangan estrus lebih banyak dibanding kelompok K- selama 23 hari masa perlakuan. Perbedaan ini menunjukkan bahwa nilai rata-rata ulangan K+ berbeda nyata dengan K- yang dibuktikan dengan notasi yang berbeda antar kedua kelompok tersebut. Pada kelompok K+ hewan coba diberikan *etinilestradiol* secara peroral dengan sonde lambung mampu meningkatkan rata-rata ulangan estrus sebesar 35,3%. Pemberian *etinilestradiol* dapat mempercepat siklus estrus, karena *etinilestradiol* merupakan estrogen sintetis. Menurut Hartono (2002), *Esinilestradiol* merupakan senyawa estrogen sintetis steroidol yaitu turunan sintetis dari estradiol alami. Sebagai turunan sintetis dari estradiol alami,

*esiniestradiol* memacu pertumbuhan endometrium dan kornifikasi vagina. Menurut Herdis (1999), pada beberapa kasus gangguan reproduksi seperti hipofungsi ovarium, pemberian *etinilestradiol* dapat mengembalikan estrus dan meningkatkan fertilitas dengan cara meregresikan folikel dominan sehingga muncul folikel dominan dari gelombang berikutnya yang menghasilkan oosit berkualitas baik.

Pada K (-) hewan tidak diberikan perlakuan apapun sehingga aktifitas estrogen murni dari fisiologis hewan coba. Berdasarkan tabel 5.2 jumlah pengulangan estrus dalam waktu 23 hari pada tikus sebanyak  $4,25 \pm 0,5$ . Hal ini sesuai dengan pendapat Akbar (2010) bahwa siklus estrus mencit berulang setiap 4 sampai 5 hari.

Pada K(+) hewan diberikan *etinilestradiol* yang merupakan esterogen sintetis sedangkan pada kelompok P4 diberikan perasan daun semanggi air yang mengandung *fitoesterogen*, dimana keduanya sama-sama mengandung esterogen yang mampu meningkatkan rata-rata ulangan siklus estrus dan mempercepat fase estrus, ditandai dengan ditemukan sel epitel yang terkornifikasi pada apusan vagina. Kadar estrogen yang tinggi akan merangsang maturasi folikel de Graff dari folikel primodial dan folikel primer di ovarium. Hal ini dapat mempercepat folikulogenesis dan fase diestrus menuju fase estrus. Berdasarkan **Tabel 5.2** pemberian *esiniestradiol* dapat mempercepat tibanya kembali siklus estrus dalam waktu 23 hari sebanyak  $5,75 \pm 0,5$ . Hal ini sesuai dengan pendapat Kumar (2005) Hormon estrogen menyebabkan peningkatan mitosis dan proliferasi sel-sel epitel dan proses pertandukan pada sel-sel epitel permukaan. Konsentrasi estrogen

yang tinggi pada saat estrus mengakibatkan penebalan dinding vagina dan mengakibatkan sel-sel epitel mengalami pertandukan dan terlepas dari dinding epitel vagina. Sel-sel pertandukan terlihat dominan pada hasil ulas vagina.

Pada perlakuan P1 dengan konsentrasi perasan daun semanggi air 20% didapatkan rata-rata ulangan estrus sebanyak  $5 \pm 0,81$  dan dengan pemberian perasan tersebut dapat meningkatkan ulangan estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 17,64%. Pada perlakuan P2 dengan konsentrasi perasan daun semanggi air 40% didapatkan rata-rata ulangan estrus sebanyak  $5,25 \pm 0,5$  dan dengan pemberian perasan tersebut dapat meningkatkan ulangan estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 23,5%. Pada perlakuan P3 dengan konsentrasi perasan daun semanggi air 60% didapatkan rata-rata ulangan estrus sebanyak  $5,5 \pm 0,57$  dan dengan pemberian tersebut dapat meningkatkan ulangan estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 29,4%. Pada perlakuan P4 dengan konsentrasi perasan daun semanggi air 80% didapatkan rata-rata ulangan estrus sebanyak  $5,7 \pm 0,5$  dan dengan pemberian tersebut dapat meningkatkan ulangan estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebesar 34,11%.

Pada keseluruhan perlakuan, baik P1, P2, P3 dan P4 dapat meningkatkan rata-rata ulangan estrus. Berdasarkan analisis tabel didapatkan konsentrasi perasan daun semanggi air yang paling banyak dalam meningkatkan ulangan estrus, yakni pada kelompok P4 dengan konsentrasi 80%, dengan konsentrasi tersebut mampu meningkatkan rata-rata ulangan estrus yang hampir sama dengan kelompok K+ dibuktikan dengan persamaan notasi antar keduanya, hal ini dikarenakan pada kelompok perlakuan diberikan perasan daun semanggi air. Pemberian perasan

daun semanggi air dapat meningkatkan ulangan siklus estrus dan mempercepat estrus karena daun semanggi air mengandung *fitoestrogen*. *Fitoestrogen* memiliki kemiripan dengan struktur kimia estrogen pada mamalia. Fungsi utama estrogen adalah menifestasi tingkah laku saat kawin pada waktu estrus, perubahan-perubahan siklik pada alat reproduksi betina, perkembangan saluran pada kelenjar mammae, dan perkembangan sifat-sifat kelamin sekunder (Glover, 2006).

Menurut Cora *et al* (2015), Fase estrus ditandai dengan terlihatnya sel-sel epitel yang mengalami penandukan (kornifikasi), tanpa inti dan berwarna pucat. Fase estrus pada mencit berlangsung selama 12 – 48 jam. Sel-sel kornifikasi terbentuk sebagai akibat pembelahan sel epitel berinti secara mitosis dengan sangat cepat. Pembelahan mitosis inti sel menyebabkan inti pada sel yang baru belum terbentuk sempurna. Pada fase ini kadar estrogen darah sangat tinggi yang berpengaruh pada vaskularisasi pada organ reproduksi. Vaskularisasi yang berlebih menyebabkan pertumbuhan epitel yang sangat cepat. Vaskularisasi berlebih menyebabkan sel epitel pecah dan inti menghilang. Selain itu estrogen juga dapat menyebabkan keratinisasi pada epitel yang luruh. Pada saat dilakukan pengamatan sitologi *vagina swab* akan banyak ditemukan sel epitel kornifikasi.

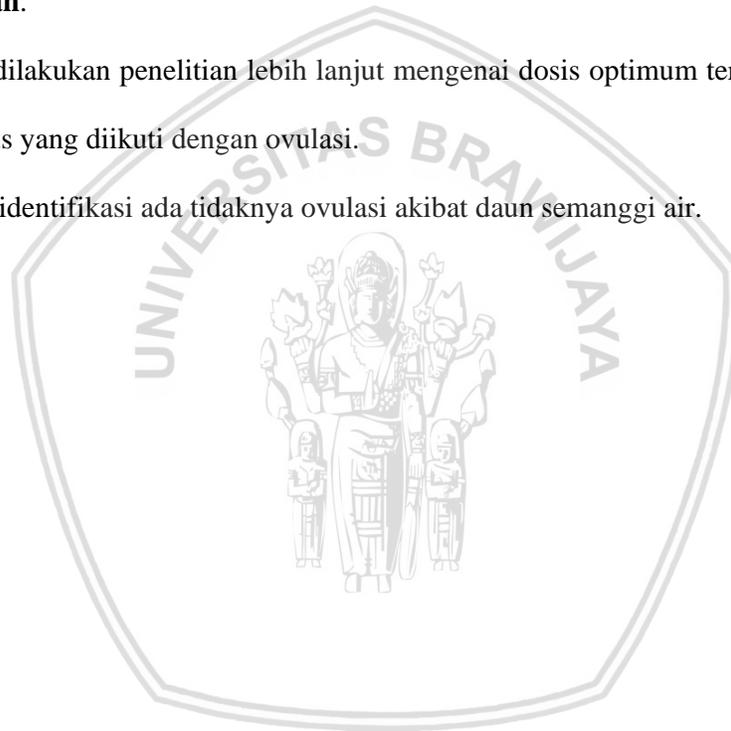
## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Perasan daun Semangi air berpengaruh terhadap percepatan siklus birahi berdasarkan ketebalan lapisan sel epitel vagina dan ulangan estrus pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina.

### 6.2 Saran.

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimum terhadap siklus estrus yang diikuti dengan ovulasi.
2. Perlu identifikasi ada tidaknya ovulasi akibat daun semangi air.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adlercreutz, H, and W. Mazur. 2007. *Phytoestrogens and Severe Disease*. Ann Med 29 (2): 95-120.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Cetakan I. 4-5. Adabia Press. Jakarta.
- Anderson, D, and D.M. Conning. 2008. *Experimental Toxicology, The basic Issues: Assessing Chemical Injury to the Reproductive System*. The Universities Press (Belfast) Ltd. London.
- Adnan. 2006. *Reproduksi dan Embriologi*. Jurusan Biologi FMIPA UNM. Makassar.
- Amiruddin, T.N., T. Siregar, Armansyah, Hamdan, Arismunandar, dan M. Rifki. 2005. Level Steroid Sapi Aceh yang di Induksi dengan Pregnant Mare's serum Gonadotropin (PMSG) dan Folikel Stimulating Hormon (FSH). *Jurnal Kedokteran Hewan*. ISSN: 1978-225X.
- Arifin, M. 2009. Analisis Mikroskopi dan Kandungan Mineral Semanggi Air Marsilea crenata Presl. (Marsileaceae). *Scientific Journals of Bogor Agricultural University* 6 (4) : 1-10.
- Ausbel, K. 2000. Tempest in a Tonic Bottle : A Bunche of Weeds Herbal Gram. *Journal American Botanical Council* 49:32-43.
- Awoniyi, C.A., D. Robert., D.N. Veeramachaeni., B.S. Hurst., K.E. Tucker and W.D. Schalff. 2001. Reproductive Sequelae in Female Rats after in Utero and Neonatal exposure to the Phytoestrogen Genistein. *Fertil. Steril. (Abstr)*: 70 (3).
- Barensten, R. 2004. Red Clover Isoflavones and Menopausal Health. *British Menopause Society Journal* 81 : 4-7.
- Bearden, H.J and J.W Fuquay. 2008. *Applied Animal Reproduction*. Virginia. Reston Publishing Company, Inc.
- Buchanan, D.L., T. Kurita, J.A. Taylor, D.B. Lubahn, and G.R. Cunha. 2008. Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139(10): 4345-4352.
- Candiasa, I. M. 2003. *Statistik Multivariant Disertasi Aplikasi dengan SPSS*. Singaraja : Unit Penerbit Ikip Negeri Singaraja.
- Cao ZT, Swift TA, West CA, Rossano TG dan Rej R. 2004. Immunoassay of estradiol: unanticipated suppression by unconjugated estriol. *Clin Chem* 50(1):160-165.
- Cassidy, A. 2005. Biological Effects of Isoflavones in Young Women: Importance of The Chemical Composition of Soyabean Products. *British Journal of Nutrition*. 74 p. 587-601.

- Darios, E.S., B. Seitz, and S.W. Watts. 2012. Smooth Muscle Pharmacology in the Isolated Virgin and Pregnant Rat Uterus and Cervix. *J of Pharmacol and Therapeu*, 341, 587-596.
- De Rensis, F. and Lopez-Gatiuz. 2007. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. *Theriogenology* 67: 209 – 216.
- Favaro WJ and Cagnon VHA. 2007. Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol and nicotine. *Int J Androl* 31:609-618.
- Eddiman W, F. 2013. *Biologi Reproduksi*. Erlangga: Jakarta.
- Elstein, M, P.G. Briston, M. Jenkins, D. Kirk, and H. Miller. 2008. Effects of low-oestrogen oral contraception on urinary excretion of luteinising hormone and ovarian steroids. *Br. Med. J.* 1:11–13.
- Fox, J.G. 2002. *Laboratory Animal Medicine* 2nd. New York: Academic pr.
- Gass, M., G. Mezrow, and R. Rebar. 2000. The Menopause. In: Sciarra, J.J. *Gynecologics and Obstetrics*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1-12.
- Glover, A and S.J. Assinder. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc.* 189: 565-573.
- Grady, J.J., L.J.W. Lu, K.E. Anderson, and M. Nagamani. 2006. Effects of *marselia crenata* consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. *American Association for Cancer Research*, 5, 63-70.
- Hardjoprano, S. 2002. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Helmut, A and Grein. 2004. The endocrine and Reproductive System: Adverse Effects of Hormonally Active Substances. *Pediatrics* vol.113.
- Hernawati. 2013. *Perbaikan Kinerja Reproduksi akibat pemberian isovlafon dari Tanaman Kedelai*. *J. Biologi*. Jurusan Pendidikan Biologi. FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- Isnaeni, W. 2006. *Fisiologi Hewan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- ISO. 2012. *Informasi Spesialite Obat Indonesia*.
- Jefferson W.N., B.E. Padilla, G. Clark, and R.R. Newbold. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *Journal of Chromatography*. B

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 777(1-2):179-189.

- Junqueira, L.C. 2007. *Histologi Dasar: Teks and Atlas*. Ed. 10. Jakarta: EGC hal 451.
- Loose, D.S., Stancel, and M. George. 2006. *Estrogens and Progestins. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: McGraw-Hill. pp. 1541–1571. ISBN 0-07-142280-3.
- Mangkoewidjojo, S. 2006. *Hewan Laboratorium dalam Penelitian Biomedik*. Jakarta : UI-Press
- Mcdonald, L.E. 2001. *Veterinary Endocrinology and Reproduction* Philadelphia: Lea and Febiger.
- Myers, P, and D. Armitage. 2004. *Rattus norvegicus*, animal diversity web. [http://animaldiversity.ummz.edu/site/accounts/information/rattus\\_norvegicus.html](http://animaldiversity.ummz.edu/site/accounts/information/rattus_norvegicus.html). [Diakses 11 Agustus 2015].
- Nalbandov, A. V. 2010. *Reproductive Physiology of Mammals and Birds*. W. H. Freeman and Company. San Fransisco.
- Nalley, dkk. 2011. Penentuan Siklus Estrus Berdasarkan Gambaran Sitologi Vagina dan Profil Hormon pada Rusa Timor (Determination Of The Estrous Cycle Based On Vaginal Cytology And Hormone Profile In Timor Hind). Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University): *Jurnal Veteriner Juni Vol. 12 No. 2*
- Nurjanah, A.A, dan A. Abdullah. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (Marsilea crenata). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan, Volume 1 : 152- 158*.
- Nursyah, Daud A. 2012. Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih ( *Rattus norvegicus*) Ovariektomi yang diberi Tepung Daging Teripang ( *Hollotura scabra*). *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor Fakultas Kedokteran Hewan.
- Patisaul, H.B., and W. Jefferson. 2010. *The pros and cons of phytoestrogens*. *Front Neuroendocrinol* 31(4) 400-419.
- Piktin, J. 2004. Redclover isoflones in practice: a clinician's view. *British Menopause Society Journal* 81 : 7-12.
- Rasyid, R., Yanwirasti, dan E. Nasrul. 2008. *Pengaruh Estrogen Terhadap Aktivitas Sel Makrofag dalam Menfagosit Candida albicans Secara In Vitro*. *Majalah Kedokteran Andalas* No.1. Vol.32. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Renita, M., H. Rosdanelli., dan Irvan. 2004. *Perombakan Zat Warna Azo Reaktif Secara Anaerob – Aerob*. *E-USU Repository*.

- Seire, J.V., F.S.Venter, J.E. Fincham, and J.J.F. Taljaard. 2001. *Hormonal vagina cytology of vervet monkeys. J Med Primatol.*
- Setchell, K.D.R. 2001. Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J.of Nutrition.* 131: 1362-1375.
- Suckow, M.A., H, Steven., and C.L, Frangklin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edition, A.* volume in American Coolege of Laboratory Animal Medicine.Academic Press.
- Suparman. E. 2012. Fitoestrogen/HRT : Pro dan Kontra. *J.Obstetri. Obstetri dan Ginekologi. Skripsi.* Manado: Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi.
- Suryanto, Aditya B. 2015. Gamnbaran Histopatologi Vagina Mencit (*Mus muscularia*) yang diinfeksi Toxoplasma gondii Secara Intra Vagina. *Skripsi.* Surabaya: Universitas Airlangga Fakultas Kedokteran Hewan.
- Taylor, P. 2004. *Practical Teratology.* WB Saunders Co. London.
- Treuting. M.P ; Dintzis M., Suzanne and Montine S., Kathleen. 2012. *Comperative Anatomy and Histology : A Mouse and Human Atlas.* United states of American ; Academic Press Publications.
- Victor, P., dan Eroschenko. 2003. *Atlas Histologi, di Fiore dengan korelasi Fungsional.* Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Zulfiati, E. 2003. Gambaran histologi Ulas Vagina Mencit (*Musmusculus albinus*) selama Siklus Estrus dengan Tinjauan Khusus Pada Distribusi Leukosit. *Skripsi.* Bogor: Institut Pertanian Bogor Fakultas Kedokteran Hewan.