

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BENGKUANG
(*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP KADAR FSH DAN
JUMLAH FOLIKEL ANTRAL PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) MODEL HIPOESTROGEN DENGAN DMPA**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
MAYASARI PUTRI ARDELA
176070400111013**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

TESIS

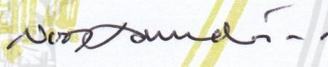
**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BENGKUANG
(*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP KADAR FSH DAN
JUMLAH FOLIKEL ANTRAL PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) MODEL HIPOESTROGEN DENGAN DMPA**

Oleh:
MAYASARI PUTRI ARDELA
176070400111013

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal : 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

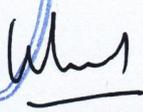
KOMISI PEMBIMBING


Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk
NIP 196709091997031001
Ketua


Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, SpMK(K)
NIP 195011101980021001
Anggota

Malang, 29 JUL 2019
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,




Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si. Med, SpA(K)
NIP 197307262005011008



TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BENGKUANG
(*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP KADAR FSH DAN
JUMLAH FOLIKEL ANTRAL PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) MODEL HIPOESTROGEN DENGAN DMPA**

Oleh:
MAYASARI PUTRI ARDELA
176070400111013

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal : 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI



Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk
NIP 196709091997031001
Ketua



Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, SpMK(K)
NIP 195011101980021001
Anggota Penguji



Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.
NIP 195510151986032001
Anggota Penguji



dr. Yahya Irwanto, SpOG(K)
NIP 196805041998031012
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 25 Juli 2019

Mahasiswa,



Nama : Mayasari Putri Ardela
NIM : 176070400111013
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



Alhamdulillahirabbil 'alamin..

Karya ilmiah ini kutujukan kepada

mama dan bapakku tercinta ♥

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) Terhadap Kadar FSH dan Jumlah Folikel Antral pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen Dengan DMPA”.

Tesis ini disusun sebagai salah satu prasyarat untuk memperoleh gelar Magister Kebidanan pada Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS. selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si. Med, SpA(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk selaku ketua komisi pembimbing dan Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, SpMK(K) selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.



5. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes selaku Penguji I dan dr. Yahya Irwanto, SpOG(K) selaku Penguji II yang telah banyak memberi masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
6. Seluruh dosen Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas ilmu yang diberikan.
7. Yang tercinta mama Dra. Endang Susilowati dan bapak Sudarmadji, S.Pd atas segala pengertian, kasih sayang, doa, bantuan moral dan materiil yang telah diberikan.
8. Sahabat bengkungku (mbak Suryanti. S., S.Keb., Bd. dan mbak Eka Frenty Hadiningsih, S.ST.) atas kerjasama dan semangatnya mulai dari penyusunan proposal, penelitian, hingga terselesaikannya tesis ini.
9. Teman-teman seperjuangan Program Studi Magister Kebidanan angkatan 2017 atas dukungan semangatnya dan semua pihak yang bersedia membantu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli 2019

Penulis

RINGKASAN

Mayasari Putri Ardela

Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Kadar FSH dan Jumlah Folikel Antral pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen dengan DMPA, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk; Anggota: Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, SpMK(K)

Keluarga Berencana (KB) merupakan suatu upaya untuk mengatur kehamilan, persalinan, jarak antar kehamilan, serta usia ideal melahirkan untuk mewujudkan keluarga yang berkualitas. Salah satu metode kontrasepsi yang paling umum digunakan adalah kontrasepsi hormonal suntik *Depot-Medroxy Progesterone Acetate* (DMPA) dengan dosis intramuskular 150 mg yang disuntikkan setiap 3 bulan. Mekanisme kerja DMPA dengan menghambat pelepasan dan sekresi GnRH dengan kadar FSH dan LH yang rendah sehingga mencegah terjadinya ovulasi. DMPA juga menyebabkan penebalan lendir serviks untuk mengurangi kemungkinan terjadinya fertilisasi. Paparan progesteron sintetik mengakibatkan kadar estradiol dalam tubuh menurun (hipoestrogen) sehingga dapat menurunkan fungsi reproduksi karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium. Untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan akibat penggunaan DMPA dapat memanfaatkan bahan alami berupa fitoestrogen yang merupakan senyawa non-steroid dari tanaman yang secara struktur kimia dan fungsional menyerupai 17β -estradiol. Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) diketahui mengandung senyawa isoflavon dengan struktur kimia menyerupai 17β -estradiol dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen yang mampu menimbulkan efek seperti estrogen endogen. Jika kondisi hipoestrogen menjadi penyebab terhambatnya fungsi ovarium, maka secara logis terapi estrogen dapat meringankan dampak dari penggunaan DMPA.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental* dengan menggunakan desain *post test only control group design* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar FSH dan jumlah folikel ovarium pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen yang dipapar dengan DMPA. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* berjumlah 25 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (KN) yang tidak dipapar DMPA dan tidak diberi ekstrak etanol bengkuang, kelompok kontrol positif (KP) yang hanya dipapar DMPA dengan dosis 2,7 mg tanpa diberi ekstrak etanol bengkuang, kelompok perlakuan 1 (P1) yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari, kelompok perlakuan 2 (P2) yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari, serta kelompok perlakuan 3 (P3) yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari. Paparan DMPA dilakukan setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali penyuntikan yang disesuaikan dengan penggunaan DMPA pada manusia selama 1 tahun. Hal ini bertujuan untuk menjadikan tikus sebagai hewan model hipoestrogen. Ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) diberikan setiap hari selama 14 hari sesuai dengan dosis pada tiap kelompok perlakuan kecuali pada KP dan KN. Pembedahan dilakukan pada fase proestrus dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar FSH dengan menggunakan metode ELISA, sedangkan ovarium diambil untuk selanjutnya dilakukan pembuatan preparat histopatologis dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) lalu dihitung jumlah folikel antral.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa paparan DMPA dapat menurunkan kadar FSH dan jumlah folikel ovarium. Terbukti rerata kadar FSH dan jumlah folikel ovarium pada KP lebih rendah dibandingkan dengan KN (*independent sample t test* $p < 0.05$). Selanjutnya penelitian ini membuktikan pemberian ekstrak etanol bengkuang dapat meningkatkan kadar FSH dan jumlah folikel ovarium pada tikus model hipoestrogen dengan DMPA dengan dosis yang paling optimal yaitu 280 mg/200 g BB/hari (*One Way Anova* $p < 0.05$).

Paparan progesteron dari DMPA akan berikatan dan berinteraksi dengan reseptor progesterin kemudian berdifusi menuju sel target, seperti hipotalamus dan hipofisis selanjutnya berikatan dengan reseptor progesteron. Progesterin akan menghambat pelepasan GnRH dari hipotalamus dan menstimulasi pelepasan FSH dan LH dari hipofisis anterior dalam kadar yang rendah. Rendahnya kadar FSH akan menghambat perkembangan dan maturasi folikel sehingga tidak terjadi ovulasi.

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) mengandung senyawa isoflavon dengan struktur kimia mirip estrogen. Konsumsi makanan yang mengandung fitoestrogen (genistein dan daidzein) dapat mempengaruhi fungsi ovarium karena fungsi ovarium dikendalikan oleh hormon yang beredar dalam tubuh, yaitu estrogen yang sebagian besar diproduksi di ovarium dan masuk dalam sirkulasi kemudian memberikan sinyal menuju otak. Estrogen menstimulasi hipotalamus untuk menghasilkan GnRH yang kemudian memberikan sinyal pada hipofisis anterior untuk menghasilkan FSH yang memberi sinyal pada ovarium untuk ovulasi. Senyawa dengan aktivitas estrogenik berpotensi mempengaruhi persinyalan ini dan menimbulkan respon karena berikatan dengan reseptor estrogen α dan β . Hipotalamus dan hipofisis merespon estrogen dengan memproduksi gonadotropin, FSH dan LH yang berperan dalam mengendalikan ovulasi. Sinyal estrogen pada ovarium berperan dalam mengendalikan ekspresi gen yang diperlukan untuk perkembangan folikel. Penggunaan bahan alami seperti bengkuang dapat dimanfaatkan menjadi sumber estrogen alami sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi pengganti hormon pada wanita dengan kondisi hipoestrogen.



SUMMARY

Mayasari Putri Ardela

Effect of Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) Ethanol Extract against FSH Levels and Total Antral Follicles in Hypoestrogenic Rats (*Rattus norvegicus*) with DMPA, Midwifery Master's Degree Program, Medical Faculty Brawijaya University. Chair of Supervisory Commission: Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk; Member: Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, SpMK(K)

Family planning (contraception) is an effort that aims to regulate the children birth, inter-pregnancy distance and ideal age to give birth to create a good quality family. One of the most commonly used contraceptive methods is injectable hormonal contraception Depot-Medroxy Progesterone Acetate (DMPA) with 150 mg an intramuscular dose which is injected every 3 months. The mechanism action of DMPA is by inhibiting the release and secretion of GnRH with low levels of FSH and LH to prevent ovulation. DMPA also causes thickening of the cervical mucus to reduce the possibility of fertilization. Exposure to synthetic progesterone results in decreased levels of estradiol (hypoestrogens) so that it can reduce reproductive function due to reduced number of follicles in the ovary. To reduce the effect of DMPA, can use natural ingredients from phytoestrogens which is non-steroidal compounds from plants that are chemically and functionally similar to 17β -estradiol. Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) is known to contain isoflavone compounds with chemical structures resembling 17β -estradiol and has benefits such as estrogen which is capable of causing endogenous estrogen-like effects. If the condition of hypoestrogens caused a delay in ovarian function, then logically estrogen therapy can alleviate the effects of using DMPA.

This research is a true experimental study using a post test only control group design to determine the effect bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) ethanol extract against FSH levels and total antral follicles in hypoestrogenic rats (*Rattus norvegicus*) given exposure to DMPA. 25 female rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain were divided into 5 groups, negative control group (KN) which not exposed to DMPA and not given bengkuang ethanol extract, positive control group (KP) which only exposed with DMPA without being given bengkuang ethanol extract, treatment group 1 (P1) exposed to DMPA and given bengkuang ethanol extract at dose 70 mg/200 g BW/day, treatment group 2 (P2) exposed to DMPA and given bengkuang ethanol extract at dose 140 mg/200 g BW/day, and treatment group 3 (P3) exposed to DMPA and given bengkuang ethanol extract at dose 280 mg/200 g BW/day.

DMPA's exposure is carried out every 3 days and repeated 4 times, adjusted to the use of DMPA in humans for 1 year. This is intended to make rats as animals hypoestrogen models. Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) ethanol extract is given daily for 14 days according to the dosage in each treatment group except in KP and KN. Surgery is performed at the proestrus phase and then blood FSH levels are examined using the ELISA method and the ovary was taken to make histopathological preparations with Haematoxylin Eosin (HE) staining and then count the number of antral follicles.

The results of this study indicate that exposure of DMPA can reduce blood FSH levels and the number of ovarian follicles. It was proven that the average FSH level of blood and the number of ovarian follicles in the KP were lower than that of KN (independent sample t test $p < 0.05$). Furthermore, this research proves ethanol extract of bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) can increase the levels of FSH and the number of ovarian follicles in rats models with DMPA hypoestrogen at dose 280 mg/200 g BW/day (One Way Anova $P < 0.05$).

Progesterone exposure from DMPA will bind and interact with progesterin receptors then diffuse towards target cells, such as the hypothalamus and the pituitary then bind to the progesterone receptor. Progestins will inhibit the release of GnRH from the hypothalamus and stimulate the release of FSH and LH from the anterior pituitary at low levels. Low FSH levels will inhibit development and follicle maturation so ovulation does not occur.

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) contains isoflavone compounds with estrogen-like chemical structures. Consumption of foods containing phytoestrogens (genistein and daidzein) can affect ovarian function because ovarian function is controlled by hormones circulating in the body, namely estrogen, which is mostly produced in the ovary and enters the circulation and then signals the brain to respond. Estrogen which is mostly produced in the ovary and enters the circulation then signals the brain. Estrogen stimulates the hypothalamus to produce GnRH which then signals the anterior pituitary to produce FSH which signals the ovary to

ovulate. Compounds with estrogenic activity have the potential to influence this signaling and cause a response because it binds to estrogen receptors α and β . The hypothalamus and pituitary respond to estrogen by producing gonadotropin, FSH and LH which play a role in controlling ovulation. The estrogen signal in the ovary plays a role in controlling the expression of genes needed for follicular development. The use of natural materials like bengkuang can be utilized as a source of natural estrogen so it can be used as an alternative to hormone replacement therapy in women with hypoestrogen conditions.



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Akademis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 DMPA	7
2.1.1 Mekanisme Kerja	7
2.1.2 Efek Samping	8
2.2 Ovarium Mamalia	10
2.2.1 Anatomi dan Histologi Ovarium Normal	10
2.2.2 Fungsi Ovarium	12
2.2.3 Folikulogenesis	13
2.3 Pengendalian Hormon Reproduksi	18
2.3.1 <i>Follicle Stimulating Hormone (FSH)</i>	19
2.3.2 Peran FSH pada Folikulogenesis	22
2.4 Fitoestrogen	23
2.4.1 Deskripsi	23



2.4.2	Mekanisme Kerja	24
2.4.3	Pengaruh Fitoestrogen terhadap Sistem Reproduksi	25
2.5	Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	26
2.5.1	Deskripsi	26
2.5.2	Potensi Fitoestrogen pada Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	27
2.5.3	Penelitian tentang Pengaruh Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Sistem Reproduksi	28
2.6	Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	30
2.6.1	Klasifikasi	31
2.6.2	Fisiologi Umum	31
2.6.3	Relasi Usia Tikus dengan Usia Manusia	32
2.6.4	Siklus Reproduksi	32
2.6.5	Pemeriksaan Apusan Vagina	36
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN		37
3.1	Kerangka Teori	37
3.2	Kerangka Konsep	39
3.3	Hipotesis	41
BAB 4 METODE PENELITIAN		42
4.1	Jenis dan Desain Penelitian	42
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	42
4.2.1	Kriteria Pengambilan Sampel	42
4.2.2	Replikasi	42
4.2.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	43
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	43
4.4	Bahan dan Alat	44
4.5	Variabel Penelitian	44
4.5.1	Variabel <i>Independent</i> (Bebas)	44
4.5.2	Variabel <i>Dependent</i> (Tergantung)	45
4.6	Definisi Operasional	45
4.7	Prosedur Penelitian	46
4.7.1	Persiapan Hewan Coba	46
4.7.2	Pembagian Kelompok Penelitian	47
4.7.3	Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba	49
4.7.4	Prosedur Pembuatan Ekstrak Bengkuang	49
4.7.5	Injeksi DMPA	51
4.7.6	Menentukan Kondisi Hipoestrogen	51
4.7.7	Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang	51
4.7.8	Prosedur Pengambilan Sampel	52
4.7.9	Pemeriksaan Kadar <i>Follicle Stimulating Hormone</i> (FSH) ...	52
4.7.10	Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologis Ovarium	53
4.7.11	Prosedur Pengamatan Jumlah Folikel Antral	55
4.7.12	Prosedur Pembuangan Hewan Coba	55
4.8	Alur Penelitian	56
4.9	Analisis Data	57
BAB 5 HASIL PENELITIAN		58
5.1	Hasil Pengamatan Laboratorium	58
5.2	Hasil Uji Prasyarat Parametrik	61
5.3	Hasil Uji Perbandingan Antar Kelompok Perlakuan	62



5.3.1	Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Kadar FSH pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipoestrogen dengan DMPA	62
5.3.2	Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipoestrogen dengan DMPA	67
BAB 6 PEMBAHASAN		71
6.1	Pengaruh Paparan DMPA terhadap Kadar FSH d pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	71
6.2	Pengaruh Paparan DMPA terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	73
6.3	Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Kadar FSH pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipoestrogen dengan DMPA	75
6.4	Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Hipoestrogen dengan DMPA	78
6.5	Keterbatasan Penelitian	80
6.6	Implementasi Kebidanan	81
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		82
7.1	Kesimpulan	82
7.2	Saran	82
DAFTAR PUSTAKA		83
LAMPIRAN		92
RIWAYAT HIDUP		105

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Fisiologi umum dari <i>Rattus norvegicus</i>	31
Tabel 4.1	Definisi Operasional	45
Tabel 5.1	Hasil Uji Normalitas Data	62
Tabel 5.2	Perbandingan Kadar FSH (ng/mL)	63
Tabel 5.3	Perbandingan Jumlah Folikel Antral	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tampilan mikroskopis dari ovarium dan anatomi internalnya	10
Gambar 2.2	Tahapan folikulogenesis dari folikel primordial sampai menjadi folikel antral	14
Gambar 2.3	Folikel primordial	15
Gambar 2.4	Korteks ovarium, folikel primordial dan primer	15
Gambar 2.5	Folikel sekunder dengan pembesaran 400 kali	16
Gambar 2.6	Folikel antral (<i>graafian follicles</i>)	17
Gambar 2.7	Korpus luteum	18
Gambar 2.8	Korpus albicans	18
Gambar 2.9	Struktur molekuler dari fitoestrogen yang paling umum	24
Gambar 2.10	Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	26
Gambar 2.11	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	30
Gambar 2.12	Empat tahap siklus estrus pada tikus setelah pemeriksaan visual vagina dan apusan vagina (sitologi)	33
Gambar 2.13	Hasil <i>vaginal smear</i> pada tikus yang diovariectomi	36
Gambar 3.1	Kerangka teori	37
Gambar 3.2	Kerangka konsep	39
Gambar 4.1	Kelompok penelitian	47
Gambar 4.2	Alur penelitian	56
Gambar 5.1	Hasil pemeriksaan apusan vagina pada tikus sebelum dan setelah dipapar DMPA	59
Gambar 5.2	Hasil pemeriksaan apusan vagina pada fase proestrus setelah pemberian ekstrak etanol bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	60
Gambar 5.3	Gambaran mikroskopis irisan ovarium tikus dengan pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE), pembesaran 100 kali	60
Gambar 5.4	Gambaran mikroskopis folikel ovarium dengan pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE), pembesaran 400 kali	61
Gambar 5.5	Histogram Rerata Kadar FSH	65



Gambar 5.6	Model Persamaan Garis Regresi Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Kadar FSH	66
Gambar 5.7	Histogram Rerata Jumlah Folikel Antral	69
Gambar 5.8	Model Persamaan Garis Regresi Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) terhadap Jumlah Folikel Antral	70



DAFTAR SINGKATAN

BMD	: <i>Bone mineral density</i>
BNT	: Beda Nyata Terkecil
cAMP	: <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
DMPA	: <i>Depot Medroxyprogesterone Acetate</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GPCR	: <i>G protein-coupled receptors</i>
hCG	: <i>Human chorionic gonadotropin</i>
HE	: <i>Haematoxylin Eosin</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IUD	: <i>Intrauterine device</i>
KB	: Keluarga Berencana
KN	: Kontrol Negatif
KP	: Kontrol Positif
LC-MS	: <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LH	: <i>Luteinizing hormone</i>
LSD	: <i>Least Significant Difference</i>
MOP	: Metode Operasi Pria
MOW	: Metode Operasi Wanita
P1	: Perlakuan 1
P2	: Perlakuan 2
P2	: Perlakuan 3

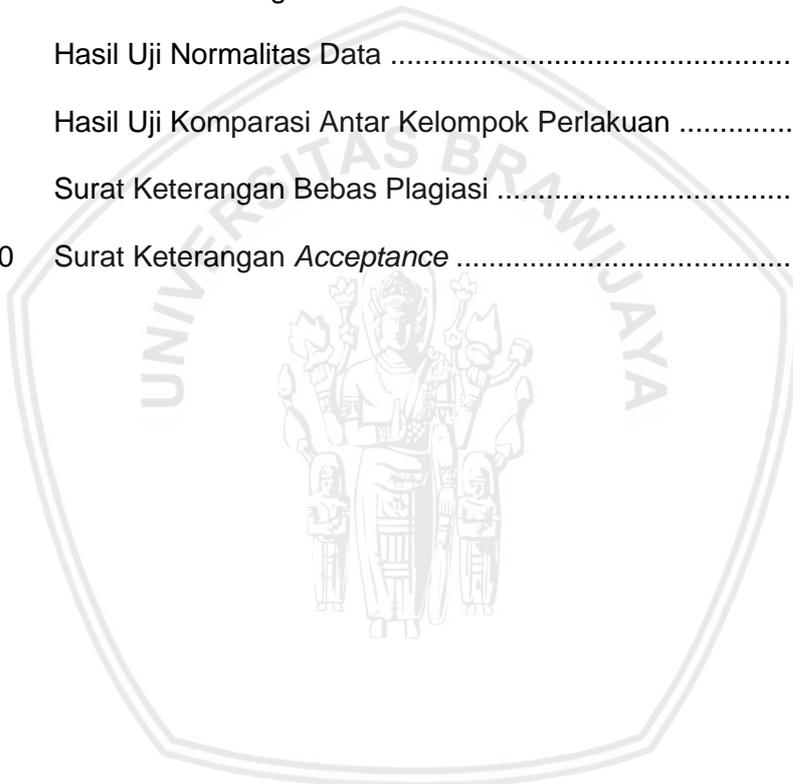


- PKC : Protein kinase C
- RNA : *Ribonucleic acid*
- SHGB : *Sex hormone binding globulin*
- WHO : *World Health Organization*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik	92
Lampiran 2	Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak Bengkuang	93
Lampiran 3	Surat Keterangan Pembelian Hewan Coba	94
Lampiran 4	Hasil Pemeriksaan Apusan Vagina	95
Lampiran 5	Penghitungan Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	96
Lampiran 6	Dokumentasi Kegiatan Penelitian	97
Lampiran 7	Hasil Uji Normalitas Data	99
Lampiran 8	Hasil Uji Komparasi Antar Kelompok Perlakuan	100
Lampiran 9	Surat Keterangan Bebas Plagiasi	103
Lampiran 10	Surat Keterangan <i>Acceptance</i>	104



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keluarga Berencana (KB) merupakan suatu upaya untuk mengatur kehamilan, persalinan, jarak antar kehamilan, serta usia ideal melahirkan untuk mewujudkan keluarga yang berkualitas (Kementrian Kesehatan RI, 2016). Berdasarkan status pemakaian kontrasepsi yang dipakai wanita kawin usia 15-49 tahun di Indonesia tahun 2017, 63,6% wanita menggunakan KB dan 36,4% sisanya tidak menggunakan KB (SDKI, 2017). Sebagian besar peserta KB aktif memilih metode kontrasepsi suntik (47,96%), pil (22,81%), implan (11,20%), IUD (10,61%), kondom (3,23%), MOW (3,54), dan MOP (0,64%) (BKKBN, 2017).

Jenis kontrasepsi yang sering digunakan salah satunya adalah kontrasepsi suntik *Depot-Medroxy Progesterone Acetate* (DMPA) dengan dosis intramuskular 150 mg yang disuntikkan setiap 3 bulan sekali. Hormon yang disuntikkan berfungsi untuk mencegah kehamilan dengan tingkat efektivitas tinggi (0,3 kehamilan per 100 wanita-tahun). Bila digunakan dengan benar dapat menekan ovulasi, menghalangi motilitas sperma melalui lendir serviks, dan mempengaruhi lapisan endometrium uterus sehingga mencegah implantasi sel telur apabila terjadi pembuahan. Karena tidak mengandung estrogen, DMPA tidak berpengaruh terhadap ASI sehingga dapat digunakan untuk wanita menyusui dan tidak memicu gangguan kardiovaskular (Speroff & Darney, 2005; Bakry *et al.*, 2008).

Efek utama dari penggunaan kontrasepsi suntik DMPA adalah perubahan menstruasi dan kembalinya kesuburan yang tertunda. Kembalinya ovulasi tertunda hingga 9-10 bulan setelah injeksi terakhir. 70% wanita pada tahun pertama penggunaan DMPA mengalami insiden perdarahan yang tidak teratur

dan perubahan berat badan sekitar 2-3 kg/tahun (Haider & Darney, 2007). Penggunaan DMPA jangka panjang dapat menyebabkan penurunan kepadatan tulang yang bersifat reversibel sekitar 5-7% pada tulang pinggul dan tulang belakang (WHO, 2007). DMPA dapat menyebabkan perubahan pada lingkungan vagina dan atrofi pada serviks yang dapat meningkatkan risiko infeksi menular seksual (IMS), meskipun bukti perubahan tersebut belum dapat disimpulkan. Efek samping potensial lainnya termasuk penurunan libido, ketidaknyamanan pada payudara, pusing, rambut rontok dan kembung (King *et al.*, 2015).

Mekanisme kerja dari DMPA dengan mempengaruhi hipotalamus dalam mensekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) sehingga berdampak pada menurunnya sekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) oleh hipofisis anterior. DMPA mencegah kenaikan LH yang menyebabkan terhambatnya ovulasi dan menekan produksi estradiol oleh ovarium, yang mana ovarium mensekresi estrogen dalam bentuk estradiol (E2) (Hatcher, 2004; Speroff & Darney, 2005). Perkembangan dan pematangan folikel ovarium dipengaruhi oleh hormon gonadotropin diantaranya FSH dan LH sehingga folikel dapat menghasilkan hormon estrogen. Sekresi hormon estrogen oleh ovarium akan memicu pelepasan LH pada saat ovulasi dan FSH yang berpengaruh terhadap perkembangan folikel ovarium. Dengan adanya reseptor FSH yang bekerja di dalam sel granulosa dan sel teka interna, maka estrogen yang dihasilkan akan merangsang perkembangan sel folikel (Cambpell *et al.*, 2004; Guyton & Hall, 2007).

Kondisi hipoestrogen pada pengguna kontrasepsi suntik DMPA akan menyebabkan disfungsi ovarium dan menurunkan fungsi reproduksi karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium (Borecky, *et al.*, 2009). Rendahnya kadar estradiol menyebabkan gangguan proses folikulogenesis karena terhambatnya ovulasi, akibatnya folikel menjadi tidak dapat berkembang dan

mengalami atresia karena terjadi apoptosis. Apoptosis dalam skala besar akan menyebabkan kerusakan jaringan yang ditandai dengan terhambatnya fungsi ovarium sehingga ovarium menjadi atrofi, tidak terjadi ovulasi, turunnya kadar estrogen dalam sirkulasi serta menurunkan fungsi reproduksi (Tasdemir *et al.*, 2009). Jika kondisi hipoestrogen adalah penyebab terhambatnya fungsi ovarium, maka secara logis terapi estrogen dapat meringankan efek yang ditimbulkan dari penggunaan kontrasepsi DMPA. Paparan estrogen eksogen (oral, vaginal, atau transdermal) diketahui dapat meningkatkan aliran darah ke mukosa vagina, meningkatkan sekresi lokal dan menebalkan epitel vagina pada pasien dengan atrofi vagina, serta memperbaiki keseimbangan pH dan mikroflora vagina sehingga dapat menurunkan risiko terjadinya infeksi vagina (Bachmann *et al.*, 2009; Reiter, 2013).

Alternatif terapi untuk mengurangi efek penggunaan kontrasepsi suntik DMPA dengan memanfaatkan sumber alami yaitu fitoestrogen yang merupakan senyawa non-steroid dari tanaman yang menyerupai 17β -estradiol atau estrogen sintetis. Fitoestrogen mampu mengikat reseptor estrogen serta berinteraksi dengan jalur sinyal estrogen (Cederroth *et al.*, 2012). Aktivitas biologis fitoestrogen yaitu menyerupai kerja estrogen endogen, mengubah sintesis dan metabolisme hormon endogen, berperan dalam sistem regulasi intraseluler dan mekanisme apoptosis (Burton & Wells, 2002; Rietjens *et al.*, 2013).

Selama ini jenis tanaman yang telah diketahui kaya akan kandungan fitoestrogen adalah kedelai. Menariknya, meskipun banyak penelitian menyakini manfaat kesehatan dari kedelai, namun olahan makanan berbahan dasar kedelai berpotensi menimbulkan penyakit radang sendi (*gout*). Kedelai memiliki kandungan purin kategori sedang, yaitu berkisar antara 100-400 mg/ 100 gram, sehingga direkomendasikan untuk membatasi asupan purin sebagai upaya menjaga agar kadar asam urat dalam batas normal (Villegas *et al.*, 2012).

Diantara negara-negara di Asia, Indonesia menduduki prevalensi *gout* tertinggi dengan 1,7% orang dewasa yang menderita penyakit ini (Kuo *et al.*, 2015). Wanita memiliki prevalensi *gout* lebih rendah dibandingkan dengan laki-laki, tetapi risiko *gout* meningkat setelah menopause karena berhubungan dengan kadar estrogen (Hak *et al.*, 2010). Pada pengguna kontrasepsi DMPA juga mengalami penurunan hormon estrogen sehingga dapat pula memicu risiko terjadinya *gout*.

Alternatif fitoestrogen lain sebagai upaya terapi akibat pemakaian DMPA namun tidak memicu penyakit radang sendi adalah dengan memanfaatkan bengkuang (*Pachyrhizus erosus*). Bengkuang merupakan tanaman yang mengandung fitoestrogen dengan kandungan isoflavon terbesarnya yaitu daidzein dan genistein. Hasil analisis dengan menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada umbi bengkuang didapatkan kadar daidzein adalah 108,831 mg/100 gram dan kadar genistein adalah 163,079 mg/100 g (Primiani, 2013). Identifikasi senyawa isoflavon pada ekstrak etanol bengkuang dengan metode *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) diperoleh kadar daidzein adalah 254 g/mol dan genistein adalah 270 g/mol (Sholihah, 2016). Bengkuang mengandung senyawa fitoestrogen yang mirip estrogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Anupongsanugool *et al.*, 2005). Berkaitan dengan asam urat, senyawa daidzein diketahui dapat menurunkan konsentrasi asam urat dengan menghambat oksidase *xanthine* yang berperan dalam produksi asam urat dan telah dibuktikan dalam penelitian Qin *et al.* (2014) bahwa pemberian suplemen daidzein efektif dalam menurunkan konsentrasi asam urat. Pemberian parutan umbi bengkuang dalam penelitian Primiani (2013) dapat meningkatkan proliferasi endometrium, kelenjar uterina, serta pematangan folikel dalam ovarium pada mencit betina premenopause

Namun, fitoestrogen dari umbi bengkuang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk meneliti tentang ekstrak etanol umbi bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) sebagai alternatif terapi akibat penggunaan kontrasepsi suntik DMPA terhadap kadar *follicle stimulating hormone* (FSH) dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar FSH dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.
2. Membuktikan ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

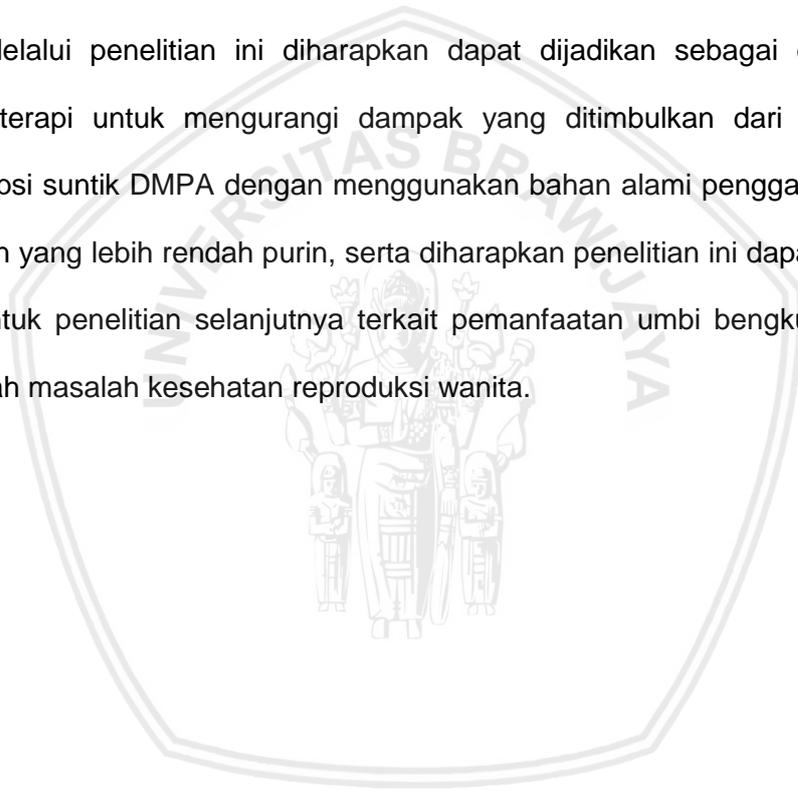
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Peneliti berharap hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan umbi bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar *follicle stimulating hormone* (FSH) dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

1.4.2 Manfaat Praktis

Melalui penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai dasar teori tentang terapi untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan dari pemakaian kontrasepsi suntik DMPA dengan menggunakan bahan alami pengganti kacang-kacangan yang lebih rendah purin, serta diharapkan penelitian ini dapat dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya terkait pemanfaatan umbi bengkuang untuk mencegah masalah kesehatan reproduksi wanita.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 DMPA

Depot Medroxyprogesterone Acetate (DMPA), juga dikenal sebagai *Depo-Provera* adalah metode kontrasepsi hormonal yang sangat efektif. Terdapat 2 formulasi DMPA yang tersedia, pertama adalah *Depo-Provera* atau DMPA IM 150 mg/ml yang terkandung dalam 1 ml vial dan diberikan setiap 12 minggu secara intramuskular. DMPA terdeteksi dalam kadar serum dalam 30 menit setelah injeksi 150 mg. Konsentrasi dalam serum jumlahnya bervariasi karena selama kurang lebih 3 bulan perlahan stabil dan setelah itu konsentrasi serum menurun secara bertahap. Formulasi kedua adalah *Depo-subQ Provera* 104 yang diberikan secara subkutan setiap 12 minggu dan telah terbukti sama efektifnya dalam menghambat ovulasi. *Depo-subQ Provera* dosis 104 mg dengan tingkat serum 30% lebih rendah daripada dosis standar DMPA IM 150 mg (King *et al.*, 2015).

2.1.1 Mekanisme Kerja

DMPA merupakan turunan dari progesteron. Mekanisme kerjanya yang utama adalah menghambat ovulasi dengan mencegah pematangan folikel. Mekanisme kerja sekunder adalah penebalan lendir serviks yang berfungsi sebagai penghalang untuk sperma dan induksi atrofi endometrium untuk mengurangi kemungkinan implantasi. Seperti hormon steroid lainnya, DMPA dimetabolisme oleh hati dan diekskresikan dalam urine (King *et al.*, 2015).

Sebagai kontrasepsi dengan kandungan hormon tunggal progestin, DMPA memberikan efek kontrasepsi dengan mengentalkan lendir serviks sehingga tidak dapat ditembus oleh sperma. Tingkat progestin yang tinggi ini

efektif dalam menghambat lonjakan LH dan sebagai hasilnya DMPA efektif dalam menghambat ovulasi. Meskipun DMPA efektif menghambat lonjakan LH, hal ini tidak sepenuhnya menekan FSH dan dengan demikian masih dapat merangsang folikel untuk terus membuat estrogen. Tingkat estrogen pengguna DMPA ditemukan kurang lebih sama pada tingkat yang ditemukan di fase folikular awal dalam siklus menstruasi normal (Becker, 2001).

2.1.2 Efek Samping

Penggunaan DMPA memberikan efek samping pada perubahan pola menstruasi dan kembalinya kesuburan yang tertunda. 70% wanita pada tahun pertama penggunaan DMPA mengalami insiden perdarahan yang tidak teratur (Haider & Darney, 2007). Variasi biasanya dimulai dengan perdarahan tidak teratur dan *spotting* selama 7 hari atau lebih atau mungkin perdarahan yang berat pada awal pemakaian. Perdarahan ini secara bertahap berkurang dengan durasi yang lebih pendek sampai wanita mengalami amenore. Sekitar 10-30% wanita mengalami amenore setelah injeksi pertama dan 40-50% terjadi setelah suntikan keempat. Tingkat perdarahan tidak teratur dan amenore merupakan efek samping untuk formulasi subkutan dan intramuskular (King *et al.*, 2015).

Penggunaan DMPA jangka panjang dapat mengalami penurunan kepadatan tulang yang bersifat reversibel sekitar 5-7% pada tulang pinggul dan tulang belakang (WHO, 2007). DMPA menekan sekresi gonadotropin sehingga menurunkan produksi estradiol ovarium. Dalam keadaan hipoestrogenik, resorpsi tulang melampaui pembentukan tulang yang menghasilkan penurunan kepadatan tulang. Wanita dengan risiko tinggi osteoporosis dan fraktur, seperti penggunaan kortikosteroid, gangguan metabolisme tulang, riwayat keluarga dengan osteoporosis atau anorexia nervosa mungkin tidak cocok untuk menggunakan DMPA jangka panjang (Harel *et al.*, 2010).

DMPA dapat menyebabkan perubahan pada lingkungan vagina dan ektopi pada serviks yang dapat meningkatkan risiko infeksi menular seksual (IMS), meskipun bukti perubahan tersebut belum dapat disimpulkan. Efek samping potensial lainnya termasuk gugup, penurunan libido, ketidaknyamanan pada payudara, pusing, rambut rontok dan kembung (King *et al.*, 2015).

Kembalinya kesuburan untuk wanita yang menggunakan DMPA cenderung memakan waktu lebih lama daripada wanita yang telah menggunakan metode hormonal lainnya. Kembalinya ovulasi tertunda hingga 9-10 bulan setelah injeksi. Penekanan ovulasi setelah penghentian DMPA tidak terkait dengan durasi penggunaan, tetapi lebih karena pengaruh berat badan sehingga dapat hamil lebih cepat setelah penghentian DMPA. Peringatan dari *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) menyarankan penggunaan DMPA kurang dari 2 tahun (King *et al.*, 2015).

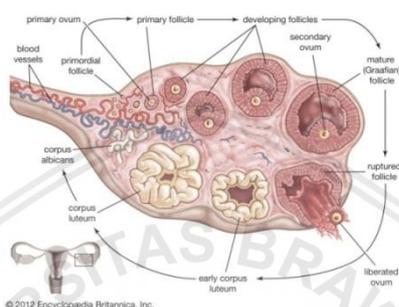
Jumlah obat yang terdeteksi dalam ASI pada wanita pengguna kontrasepsi DMPA tidak terbukti ada perubahan yang merugikan pada komposisi, kualitas, ataupun jumlah ASI. Neonatus dan bayi yang menerima ASI yang mengandung DMPA tampaknya tidak memiliki efek perkembangan dan perilaku yang merugikan hingga pubertas. Dianjurkan untuk menggunakan kontrasepsi progestin untuk ibu menyusui sampai 6 minggu pertama pascapersalinan (King *et al.*, 2015).

Efek DMPA pada kanker reproduksi tampaknya sama dengan kontrasepsi oral kombinasi. Analisis gabungan dari studi epidemiologi menyimpulkan bahwa wanita yang menggunakan *medroxyprogesterone* tidak meningkatkan risiko kanker payudara. Selanjutnya, tidak ada risiko yang meningkat terkait dengan durasi penggunaan. DMPA memiliki efek perlindungan terhadap kanker endometrium yang setidaknya sama kuatnya dengan kontrasepsi oral kombinasi. Mengenai neoplasia serviks, studi tentang DMPA tidak menunjukkan efek

samping yang kuat, tetapi seperti dengan kontrasepsi oral kombinasi, belum pasti apakah tidak ada hubungan atau ada sedikit peningkatan risiko (Aronson, 2016a).

2.2 Ovarium Mamalia

2.2.1 Anatomi dan Histologi Ovarium Normal



Gambar 2.1 Tampilan mikroskopis dari ovarium dan anatomi internalnya (Encyclopaedia Britannica Inc., 2012).

Ovarium merupakan organ dalam rongga panggul dengan satu bagian ovarium melekat pada ligamentum latum uteri (mesovarium) dan bagian yang lain pada dinding uterus melalui ligamentum ovarii proprium. Dengan permukaannya terdapat satu lapis sel epitel germinal. Korteks ovarium terdapat di bawah tunika albuginea. Jaringan ikat dengan banyak pembuluh darah disebut medula. Bagian korteks dan medula ini menyatu (Eroschenko, 2013).

Pada fase embrionik, sel germinal membelah secara mitosis kemudian memasuki fase pertama meiosis tanpa menyelesaikannya. Pada tahap perkembangan ini terbentuk oosit primer. Folikel primordial merupakan satu oosit primer yang dikelilingi oleh selapis sel folikular. Memasuki masa pubertas, folikel primordial berkembang menjadi folikel primer, sekunder, dan matur yang tersebar di korteks dan medula ovarium. Folikel ovarium dapat mengalami degenerasi menjadi atresia dan kemudian ditelan oleh makrofag yang berlangsung saat sebelum lahir dan berlanjut selama masa subur (Eroschenko, 2013).

Secara histologi, ovarium terdiri atas bagian-bagian berikut ini: (Amitrano & Tortora, 2012)

1. *Germinal epithelium*. Merupakan lapisan epitelium yang menutupi permukaan ovarium.
2. *Tunica albuginea*. Berupa kapsul berwarna keputihan dari jaringan ikat yang padat dan tidak teratur yang berada jauh di dalam epitel germinal.
3. *Ovarian cortex*. Bagian yang terletak jauh di dalam *tunica albuginea* yang terdiri dari jaringan ikat padat dan berisi folikel ovarium.
4. *Ovarian medulla*. Bagian yang terletak jauh di dalam korteks ovarium yang berisi pembuluh darah, pembuluh limfatik, dan saraf.
5. *Ovarian follicles*. Letaknya berada di korteks dan terdiri dari oosit (ovum imatur). Ketika sel-sel di sekitarnya membentuk lapisan tunggal maka disebut sebagai sel folikel, dan dalam perkembangannya sel folikel membentuk beberapa lapisan yang disebut sebagai sel granulosa. Sel-sel yang ada di sekitarnya memberikan nutrisi untuk oosit yang sedang berkembang dan mulai mengeluarkan estrogen ketika folikel tumbuh lebih besar. Folikel ovarium mengalami serangkaian perubahan sebelum ovulasi dengan berkembang melalui beberapa tahapan yang berbeda. Folikel yang paling banyak dan tersusun di perifer disebut folikel promordial. Jika folikel primordial berkembang menjadi ovulasi maka folikel akan bertransformasi secara berurutan menjadi folikel primer, kemudian folikel sekunder dan folikel yang akhirnya matang (*Graafian*).
6. *Mature follicle (Graafian)*. Folikel yang matang berkembang di bawah pengaruh hormon yang dilepaskan dari kelenjar pituitari yaitu *follicle stimulating hormone* (FSH) selama fase folikular dari siklus menstruasi. Dalam siklus normal, hanya satu folikel yang matang sementara sisanya terdegradasi. Folikel yang matang kemudian menghasilkan estrogen yang

berfungsi untuk mempersiapkan lapisan uterus bagian dalam untuk menerima dan implantasi ovum yang telah dibuahi. Estrogen kemudian menekan produksi FSH dari kelenjar pituitari sehingga mengakibatkan lonjakan *luteinizing hormone* (LH) dan terjadi ovulasi.

7. *Corpus luteum*. Terbentuk di ovarium di lokasi folikel matang dan melepaskan sel telur yang telah ovulasi. Korpus luteum mensekresi hormon progesteron yang menyebabkan perubahan dalam uterus yang membuatnya lebih cocok untuk implantasi ovum yang telah dibuahi dan sumber nutrisi embrio. Jika ovum tidak dibuahi, korpus luteum menjadi tidak aktif setelah 10-14 hari dan terjadi menstruasi.

2.2.2 Fungsi Ovarium

1. Perkembangan Gamet

a. Oogenesis

Perkembangan oosit (oogenesis) dimulai dari *primordial germ cells* kemudian memproduksi oogonium secara mitosis. Oogonia kemudian menjadi oosit primer dan mengalami meiosis pertama. Oosit primer berada pada fase diploten meiosis pertama sampai mengalami lonjakan LH praovulasi. Kemudian, meiosis pertama mengalami inisiasi ulang dan membran nukleus oosit (*germinal vesicle*) menjadi hancur. Meiosis oosit yang tidak seimbang menghasilkan oosit sekunder haploid yang besar dan badan polar pertama haploid yang kecil. Badan polar ini dapat membelah lagi atau tetap tunggal. Selanjutnya, oosit sekunder memulai pembelahan meiosis kedua, tetapi pada tahap ini terhenti pada metafase sampai ada penetrasi sperma pada oosit yang terjadi di saluran telur. Penyelesaian tahap

meiosis kedua menghasilkan ovum yang haploid dan badan polar sekunder (Bahr, 2018).

b. Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan urutan perkembangan yang diatur oleh sejumlah gen, faktor transkripsi, dan hormon. Selama embriogenesis pada manusia dan perkembangan postnatal pada tikus, oosit dalam keadaan berkelompok. Oosit memasuki fase meiosis selama kehidupan embrio. Ketika oosit terpisah menjadi oosit individu akan membentuk folikel primordial dan mengalami perkembangan lebih lanjut yang disebut dengan oogenesis. Pematangan oosit (oogenesis) sangat erat kaitannya dengan perkembangan folikel karena faktor-faktor yang dihasilkan oleh oosit memiliki dampak besar pada perkembangan granulosa dan lapisan teka (Bahr, 2018).

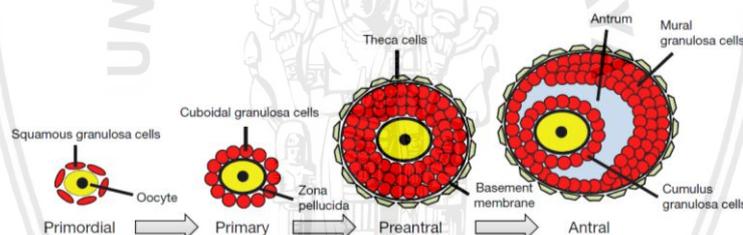
2. Produksi Hormon

Fungsi lain dari ovarium adalah untuk mensekresikan hormon yang bekerja pada hipotalamus dan hipofisis untuk mengatur sekresi hormon oleh kedua jaringan ini sehingga terbentuk aksis hipotalamus-hipofisis pada ovarium. Hormon ovarium juga mengatur fungsi saluran reproduksi dan proses reproduksi (Bahr, 2018).

2.2.3 Folikulogenesis

Fungsi utama ovarium adalah berperan dalam pengembangan gamet wanita (oosit) untuk pembuahan, perbanyakan spesies, produksi serta sekresi hormon steroid seks yang mengatur kesehatan reproduksi dan non-reproduksi. Kedua fungsi penting ovarium ini dikendalikan oleh folikel ovarium yang merupakan unit fungsional ovarium (Hannon & Curry, 2018). Folikulogenesis dimulai dengan perkembangan folikel primordial dan berakhir dengan ovulasi

atau kematian karena atresia. Folikulogenesis adalah proses yang sangat panjang yang terbagi menjadi dua tahapan. Fase pertama adalah fase pra-antral yang dikendalikan oleh faktor pertumbuhan melalui mekanisme autokrin atau parakrin yang ditandai oleh perkembangan dan diferensiasi oosit. Sedangkan yang kedua adalah fase antral yang diatur oleh FSH dan LH serta oleh faktor pertumbuhan dan ditandai oleh peningkatan ukuran folikel (hingga sekitar 25-30 mm). Proses folikulogenesis terjadi di dalam korteks ovarium. Folikulogenesis merupakan proses untuk mencapai tingkat organisasi yang lebih tinggi secara berturut-turut melalui proliferasi sel dan *cytodifferentiation*. Terdapat empat peristiwa utama perkembangan folikel antara lain: folikel primordial, perkembangan folikel pre-antral, seleksi dan pertumbuhan folikel antral, dan atresia folikel (Williams & Erickson, 2012).



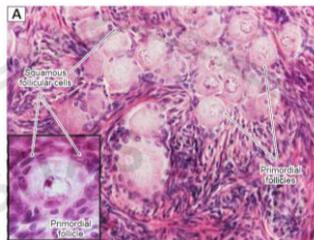
Gambar 2.2 Tahapan folikulogenesis dari folikel primordial sampai menjadi folikel antral.

Keterangan: Folikel mengandung oosit yang dikelilingi oleh sel somatik (sel granulosa dan sel teka). Pada tahap perkembangan selanjutnya terdapat ruang berisi cairan yang disebut antrum. Folikel primordial mengandung oosit yang dikelilingi oleh satu lapisan sel granulosa skuamosa. Folikel-folikel ini berkembang menjadi folikel-folikel primer yang mengandung oosit yang dikelilingi oleh satu lapisan sel-sel granulosa. Folikel primer berkembang menjadi folikel pre-antral yang mengandung oosit yang dikelilingi oleh beberapa lapisan sel granulosa dan membran basal yang memisahkan sel-sel ini dari sel teka. Folikel pre-antral berkembang menjadi folikel antral yang mengandung oosit yang dikelilingi oleh beberapa lapisan sel granulosa, antrum, dan membran basal yang memisahkan sel granulosa dari sel teka. Folikel antral berkembang lebih lanjut ke folikel pre-ovulasi yang mampu ovulasi (Hannon & Flaws, 2015).

1. Folikel Primordial

Folikel primordial adalah jenis folikel terkecil yang berdiameter sekitar 40 μm dan terdiri dari oosit dengan diameter 30 μm dan paling banyak terdapat di korteks ovarium (Townson & Combelles, 2012). Setiap folikel

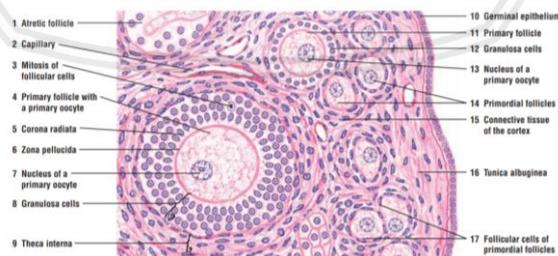
primordial mengandung sel germinal (oosit primer) dalam keadaan istirahat yang dapat bertahan selama 50 tahun. Oosit primer dikelilingi oleh lapisan sel folikel. Sekitar 1 juta folikel terdapat di ovarium pada saat kelahiran, namun hanya beberapa ratus folikel ini yang menjadi matang. Folikel mulai tumbuh saat pubertas dan secara konstan hilangnya folikel terjadi sepanjang masa reproduksi. Saat menopause, hanya tersisa beberapa folikel saja (Cui *et al.*, 2011).



Gambar 2.3 Folikel primordial (Cui *et al.*, 2011).

2. Folikel Primer

Folikel primer merupakan perkembangan dari folikel primordial yang berproliferasi secara mitosis. Reseptor FSH terbentuk saat tahapan folikel primer terbentuk yang tidak tergantung pada gonadotropin hingga tahap folikel antral yang membelah sampai meiosis I tahap profase (Linda & Heffner, 2008).



Gambar 2.4 Korteks ovarium, folikel primordial dan primer (Eroschenko, 2013).

3. Folikel Sekunder

Folikel sekunder merupakan lanjutan perkembangan dari folikel primer yang terdiri dari oosit yang lebih berkembang yang dikelilingi oleh zona pelusida, dua hingga delapan lapisan sel kolumnar granulosa, dan

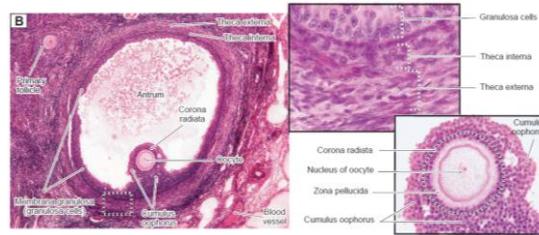
lapisan teka yang menempel pada lamina basal. Adanya lapisan teka adalah merupakan tanda perkembangan folikel sekunder. Sel teka terdiri dari beberapa lapisan sel mirip fibroblast yang memanjang di sekitar folikel. (Conti & Chang, 2016). Seiring dengan bertambahnya ukuran folikel, terdapat cairan (*liquor follicularis*) yang menumpuk diantara sel-sel folikular. Daerah yang mengandung cairan tersebut akhirnya menyatu dan membentuk rongga yang disebut dengan antrum. Folikel dengan rongga antrum dengan berbagai ukuran merupakan folikel sekunder atau folikel antral (Eroschenko, 2008).



Gambar 2.5 Folikel sekunder dengan pembesaran 400 kali (Geneser, 2007).

4. Folikel Matur (*Graafian Follicles*)

Selama tahap akhir perkembangan folikel sekunder terdapat cairan yang menumpuk diantara beberapa sel granulosa. Ketika folikel mencapai diameter sekitar 400 μm , cairan bergabung ke dalam ruangan yang disebut antrum. Folikel ini didefinisikan sebagai folikel matur atau *Graafian*. Proses kavitasi atau pembentukan antrum awal menghasilkan sel-sel granulosa untuk membentuk folikel *Graafian* dengan ukuran antrum yang besar dan sel granulosa yang tipis. Sel granulosa yang memanjang akan terbentuk korona radiata yang dipertahankan sesaat ketika ovum melalui tuba uterina hingga dibuahi spermatozoa (Geneser, 2007; Conti & Chang, 2016).



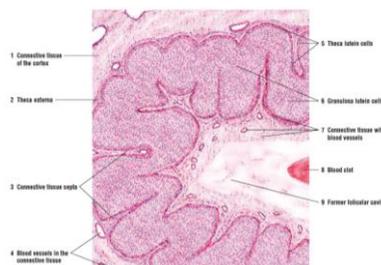
Gambar 2.6 Folikel antral (*graafian follicles*) (Cui *et al.*, 2011).

Fase ini merupakan proses seleksi folikel dominan yang akan ovulasi. Kadar FSH yang menurun sehingga folikel antral yang lebih kecil akan mengalami atresia, sedangkan folikel dominan akan terus tumbuh dengan mengakumulasi jumlah sel-sel granulosa dan reseptor FSH yang lebih banyak. Kadar estrogen yang meningkat dalam folikel akan memberi umpan balik positif ke hipofise untuk menghasilkan lonjakan LH. Lonjakan LH tersebut menyebabkan terbentuknya progesteron di sel-sel granulosa. FSH, LH, dan progesteron menstimulasi enzim-enzim proteolitik di dinding folikel sehingga mudah ruptur. Prostaglandin yang terbentuk menyebabkan otot-otot polos ovarium berkontraksi sehingga membantu pelepasan ovum pada saat ovulasi (Wiknjosastro, 2009). Siklus ovarium berada di bawah kendali hormon FSH dan LH yang diproduksi oleh gonadotropin dari kelenjar pituitari anterior. FSH merangsang produksi estrogen dan pertumbuhan folikel, sedangkan LH menstimulasi pembelahan meiosis dari oosit primer, ovulasi, dan perkembangan korpus luteum (Cui *et al.*, 2011).

5. Korpus Luteum

Ovulasi mengakibatkan dinding folikel yang telah pecah mengalami kolaps dan berlipat-lipat. Tahapan ini merupakan fase luteal yang dipengaruhi oleh LH sehingga berubah menjadi jaringan endokrin (korpus luteum) (Eroschenko, 2013). Lipatan dinding korpus luteum mengandung sel lutein granulosa dan sel teka lutein sebagai penghasil hormon steroid, terutama menghasilkan progesteron. Sel-sel teka lutein yang lebih kecil juga

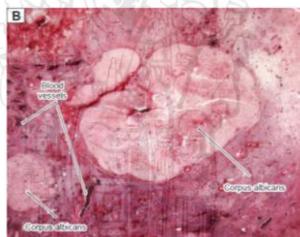
dapat mensekresi hormon steroid terutama progesteron dan androgen (Cui *et al.*, 2011).



Gambar 2.7 Korpus luteum (Eroschenko, 2013).

6. Korpus Albicans

Dengan tidak adanya pembuahan, korpus luteum hanya aktif dalam waktu yang singkat (sekitar 10-14 hari). Korpus luteum berdegenerasi, berkurang ukurannya, dan membentuk struktur yang disebut korpus albicans (Cui *et al.*, 2011).



Gambar 2.8 Korpus albicans (Cui *et al.*, 2011).

2.3 Pengendalian Hormon Reproduksi

Siklus reproduksi laki-laki dan perempuan dikendalikan oleh hormon dari hipotalamus dan hipofisis anterior dengan hormon dari jaringan dan organ reproduksi. Pada kedua jenis kelamin, hipotalamus memantau dan menjadi penyebab pelepasan hormon dari kelenjar pituitari. Ketika hormon reproduksi diperlukan, hipotalamus mengirim *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) ke hipofisis anterior kemudian mensekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) dari hipofisis anterior menuju aliran darah. Perlu diperhatikan bahwa tubuh harus mencapai masa pubertas agar kelenjar adrenal

yang melepaskan hormon yang harus tersedia untuk produksi GnRH. Meskipun FSH dan LH dinamai sesuai fungsinya dalam reproduksi wanita, kedua hormon ini diproduksi pada laki-laki juga dan memainkan peran penting dalam mengontrol reproduksi (Molnar & Gair, 2013).

Pengendalian reproduksi pada wanita lebih kompleks. Hormon pituitari anterior menyebabkan pelepasan hormon FSH dan LH. Selain itu, estrogen dan progesteron dilepaskan dari folikel yang berkembang. Estrogen adalah hormon reproduksi pada wanita yang membantu dalam pertumbuhan kembali endometrium, ovulasi, dan penyerapan kalsium yang berperan dalam menentukan karakteristik seksual sekunder pada perempuan. Hal ini termasuk perkembangan payudara, pelebaran panggul, dan periode yang lebih pendek diperlukan untuk pematangan tulang. Progesteron membantu dalam pertumbuhan kembali endometrium dan penghambatan pelepasan FSH dan LH. FSH merangsang perkembangan ovum yang berkembang dalam struktur yang disebut folikel. Sel folikel menghasilkan hormon inhibin yang menghambat produksi FSH. LH juga memainkan peran dalam perkembangan ovum, induksi ovulasi, dan stimulasi produksi estradiol dan progesteron oleh indung telur. Estradiol dan progesteron adalah hormon steroid yang mempersiapkan tubuh untuk kehamilan. Estradiol menghasilkan karakteristik seks sekunder pada wanita, sedangkan estradiol dan progesteron berperan mengatur siklus menstruasi (Molnar & Gair, 2013).

2.3.1 Follicle Stimulating Hormone (FSH)

Follicle stimulating hormone (FSH) adalah glikoprotein yang disekresi oleh hipofisis dan bersama dengan *luteinizing hormone* (LH) memainkan peran sentral dalam reproduksi mamalia. Dalam ovarium, FSH menstimulasi folikulogenesis dan steroidogenesis yang pada gilirannya mempersiapkan

saluran reproduksi wanita untuk pembuahan, implantasi, dan kehamilan (Messinis *et al.*, 2014; Simoni & Casarini, 2014).

Gonadotrop adalah sel pituitari yang mensintesis FSH yang diklasifikasikan dalam tiga kategori berdasarkan hasil pewarnaan *immunocytochemical*. Sebagian besar gonadotrop termasuk dalam kategori sel yang mensintesis FSH dan LH, sementara kategori lain tersusun atas sel yang secara khusus mensintesis FSH atau LH. Sekresi gonadotropin terutama distimulasi oleh polipeptida GnRH hipotalamus. GnRH dilepaskan dengan cara pulsatil oleh neuron yang berakhir pada pembuluh darah yang berjalan di sepanjang tangkai hipofisis. Pembuluh-pembuluh ini merupakan bentuk khusus dari sistem peredaran darah, yang disebut dengan "sistem portal". Sistem portal ditandai oleh vena-vena khusus yang timbul dalam satu sistem organ dan berakhir pada yang lain sebelum kembali ke jantung. Vena tersebut membawa pulsasi GnRH ke gonadotrop di kelenjar pituitari dan merangsang sintesis dan pelepasan pulsatil dari FSH dan LH. Adanya perubahan pada pola pulsasi GnRH akan menghasilkan perubahan pada pola sekresi FSH yang diatur oleh peningkatan kalsium intraseluler (Santi *et al.*, 2018).

FSH bekerja di ovarium dengan menstimulasi folikulogenesis. Selama perkembangan janin mamalia, sel-sel germinal primitif di ovarium memasuki meiosis dan tertahan selama profase pada meiosis I. Setiap oosit dikelilingi oleh satu lapisan sel dan memasuki fase istirahat. Mekanisme stimulasi folikel primordial untuk memulai folikulogenesis belum diketahui, tetapi diduga akibat aksi dari gonadotropin. Terdapat dua lapisan sel somatik yang berkembang di sekitar oosit yaitu sel teka pada lapisan luar dan sel granulosa pada lapisan dalam. Kedua jenis sel berproliferasi dan meningkatkan ukuran folikel sampai rongga tersebut berisi cairan atau disebut dengan antrum. Folikel yang matang atau antral menandai akhir dari folikulogenesis dan menunjukkan fase ovulasi

sehingga menghasilkan pelepasan oosit dan beberapa sel granulosa yang mengelilinginya. Selama periode periovulasi, faktor antiinflamasi diproduksi dan muncul untuk membantu penyembuhan dengan cepat dan vaskularisasi dari folikel yang pecah. Sel teka dan granulosa yang tersisa di folikel yang pecah berdiferensiasi menjadi sel luteal lalu membentuk korpus luteum yang menjadi ciri fase luteal pada siklus ovarium. Involusi cepat dari korpus luteum disebut luteolisis dan diatur oleh faktor-faktor tertentu. Luteolisis diperlukan sebelum siklus ovarium berikutnya dimulai. Fase folikular, ovulasi, fase luteal, dan luteolisis membentuk siklus ovarium dan FSH memainkan peran penting hanya selama fase pertama dari siklus ovarium (Rimon-Dahari *et al.*, 2016).

Sel teka dari perkembangan ovarium menghasilkan androgen yang merespon terhadap LH. FSH menstimulasi sel granulosa untuk menghasilkan enzim aromatase yang berfungsi merubah androgen yang dihasilkan oleh sel teka menjadi estradiol, sehingga mengerahkan umpan balik negatif pada produksi gonadotropin oleh hipofisis. Jumlah sel granulosa meningkat dengan mitosis yang terjadi di bawah pengaruh FSH yang menginduksi rangsangan proliferasi yang secara khusus dimediasi oleh FSHR di permukaan sel. Dalam perkembangan folikel, FSH juga meningkatkan produksi estradiol dan jumlah reseptor LH pada sel teka dan granulosa. Dengan peningkatan reseptor LH pada sel granulosa dari satu atau lebih folikel pada kondisi terjadi penurunan FSH, hanya folikel-folikel dengan gonadotropin dan stimulasi estrogen yang cukup yang akan meneruskan proses folikulogenesis. Ketika folikel membesar, terbentuk rongga di sekitar oosit sehingga lapisan sel granulosa dan cairan mengelilinginya, tetapi batang sel granulosa tetap melekat pada folikel lainnya. Setelah tingkat estradiol sirkulasi yang diproduksi oleh folikel *Graafian* meningkat, estradiol menyebabkan pelepasan LH dan FSH secara tiba-tiba yang kemudian menyebabkan ovulasi. Setelah ovulasi terjadi, peran FSH sangat

berkurang dan pembentukan korpus luteum serta pemeliharaan endometrium uterus berada di bawah pengaruh LH (Santi *et al.*, 2018)

2.3.2 Peran FSH pada Folikulogenesis

FSH memiliki peran kunci dalam fungsi reproduksi. Pada pria FSH berperan pada fungsi sel sertoli dan spermatogenesis, sedangkan pada wanita berperan merangsang pertumbuhan folikel pra-ovulasi akibat maturasi dari FSH sehingga mampu berovulasi dan untuk membentuk korpus luteum sebagai respon terhadap lonjakan LH pada pertengahan siklus. Perkembangan folikel dari primordial ke tahap pra-ovulasi membutuhkan waktu beberapa bulan. Studi *in-vitro* menunjukkan bahwa faktor-faktor lain mungkin terlibat dalam tahap awal perkembangan folikel dan apoptosis (kematian sel yang terprogram), antara lain: aktivin, mengubah faktor pertumbuhan β , protein morfogenetik tulang, pertumbuhan dan diferensiasi faktor p, estrogen, androgen, insulin, dan *insulin-like growth factor-1*. Peran faktor-faktor ini pada awal perkembangan folikel antral menjadikan FSH lebih responsif untuk merangsang pertumbuhan. Akhir dari folikel ini menjadi atresia kecuali satu folikel yang akan tumbuh hingga pematangan akhir ke tahap pra-ovulasi. Pada akhir fase luteal, awal dari folikel antral berdiameter 2-5 mm. Sel granulosa dari folikel antral ini tampaknya lebih sensitif terhadap stimulasi FSH. Akibat dari kematian korpus luteum dan penurunan produksi estrogen berikutnya, selama transisi luteo-folikuler konsentrasi serum FSH meningkat untuk mempertahankan kadarnya pada hari-hari pertama fase folikuler. Untuk memulai proses perkembangan folikel, FSH harus mencapai ambang dalam arti konsentrasi kritis FSH harus dicapai. Pada wanita yang anovulasi, perubahan sekitar 10-30% cukup untuk memulai perkembangan folikel (Vegetti & Alagna, 2006).

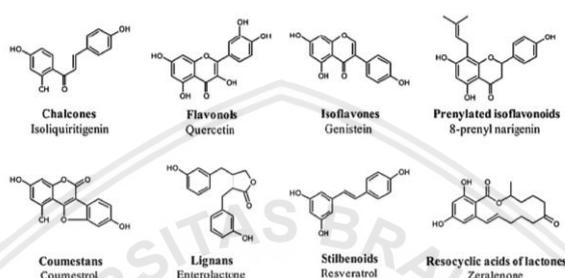
Dari pertengahan fase folikuler hingga akhir fase folikuler, sel granulosa mengalami aktivitas aromatase. Aktivitas enzimatis ini menyebabkan peningkatan estradiol, dan sebagai akibatnya terjadi penurunan konsentrasi serum FSH secara progresif karena umpan balik negatif. FSH berfungsi menginduksi pembentukan reseptor LH pada sel granula pra-ovulasi folikel. Aktivitas LH pada reseptornya akan mengaktifkan *adenyl cyclase* dengan memproduksi cAMP yang merupakan respon aditif untuk FSH. Oleh karena itu, folikel yang matang mengurangi ketergantungannya pada FSH dengan memperoleh reseptor dan respons LH. Di sisi lain, konsentrasi FSH yang lebih rendah merubah folikel yang kurang matang menjadi folikel atresia (Vegetti & Alagna, 2006).

2.4 Fitoestrogen

2.4.1 Deskripsi

Fitoestrogen merupakan senyawa alami nonsteroid tanaman dengan struktur atau fungsi mirip dengan estrogen mamalia, terutama 17β -estradiol. Fitoestrogen atau senyawa metabolit aktifnya memberikan efek estrogenik pada sistem saraf pusat, sistem reproduksi pria dan wanita, menginduksi siklus estrus, dan merangsang pertumbuhan saluran genitalia serta kelenjar susu pada wanita. Fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen, meniru struktur estradiol, dapat bertindak sebagai agonis, agonis parsial, atau antagonis yang menginduksi produk estrogen yang responsif, serta dapat memberikan efek metabolik yang tidak terkait dengan reseptor estrogen. Fitoestrogen dianggap sebagai pengganggu endokrin karena bahan kimia ini dapat mengganggu sistem endokrin tubuh dan menghasilkan efek perkembangan, reproduksi, dan neurologis yang merugikan baik pada manusia maupun hewan. Sebagian besar literatur telah mempublikasikan efek menguntungkan dari fitoestrogen pada

manusia terkait dengan menurunnya aterosklerosis, osteoporosis, angiogenesis, diabetes, dan efek vasomotor (*hot flushes*) saat menopause dan bertindak sebagai antioksidan, antineoplastik, anti-inflamasi, dan probiotik. Lebih sedikit publikasi yang membahas efek merugikan dari fitoestrogen yang menyebabkan infertilitas pada ternak dan kemungkinan proses reproduksi yang terganggu pada manusia (Mostrom & Evans, 2018).



Gambar 2.9 Struktur molekuler dari fitoestrogen yang paling umum (Michel *et al.*, 2013).

Berdasarkan struktur kimia dan pola biosintesisnya, fitoestrogen dapat dibagi dalam 4 kelompok utama fitoestrogen, antara lain: isoflavonoids, flavonoids, stilbenes, dan lignans (Gambar 2.9). Dari kelompok tersebut yang jumlahnya paling banyak adalah flavonoids, dimana coumestans, prenylated flavonoid, dan isoflavones memiliki efek estrogenik terbesar. Isoflavonoids termasuk genistein, daidzein, coumestrol, dan equol, sedangkan yang termasuk dalam prenylated flavonoid adalah 8-prenylnaringenin, stilbenes termasuk resveratrol, dan lignan termasuk enterodiol dan enterolactone (Aronson, 2016b).

2.4.2 Mekanisme Kerja

Fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen α dan β , lalu setelah berikatan dengan ligan, reseptor-reseptor ini berpindah dari sitoplasma menuju nukleus kemudian mengikat dan mempengaruhi daerah kontrol transkripsi dari DNA atau RNA kecil dan oleh karena itu dapat mengekspresikan gen-gen spesifik. Fitoestrogen dapat berpotensi mempengaruhi seluruh proses

yang diatur oleh estrogen termasuk induksi *sex hormone binding globulin* dan inhibisi aromatase. Reseptor estrogen terdapat dalam jaringan yang berbeda, misalnya pada sistem saraf pusat (termasuk hipotalamus-*hypophysial axis*), gonad, saluran reproduksi, plasenta, kelenjar susu, tulang, saluran gastrointestinal, paru-paru. Hal ini menunjukkan bahwa fitoestrogen dapat memberikan efek hormonal spesifik pada jaringan (Sirotkin & Harrath, 2014). Efek-efek spesifik reseptor estrogen yang dapat terjadi misalnya, reseptor estrogen α dapat memicu proliferasi sel, sementara reseptor estrogen β berperan pada apoptosis seluler (Rietjens *et al.*, 2013).

2.4.3 Pengaruh Fitoestrogen terhadap Sistem Reproduksi

Molekul eksogen yang mirip estrogen dapat memicu dan merusak proses reproduksi. Sebagai contoh, isoflavon genistein mampu menstimulasi produksi progesteron ovarium, estradiol dan cAMP, pematangan oosit dan pengembangan zigot preimplantasi. Konsumsi produk yang mengandung fitoestrogen dengan tingkat isoflavon tinggi dapat mempengaruhi fungsi reproduksi dan perubahan fungsi hipotalamus dan hipofisis. Efek negatif dari fitoestrogen pada sistem reproduksi pada beberapa penelitian menyebutkan adanya dampak negatif dari fitoestrogen (Sirotkin & Harrath, 2014).

Paparan fitoestrogen pada wanita saat periode pra dan pascamenopause dapat mencegah gejala menopause akibat turunnya produksi estrogen endogen, serta tidak ada efek samping negatif dari fitoestrogen pada kesehatan payudara dan endometrium (Bedell *et al.*, 2012). Oleh sebab itu, banyak wanita pascamenopause sering menganggap fitoestrogen sebagai alternatif yang lebih aman daripada terapi sulih hormon (Poluzzi *et al.*, 2014).

2.5 Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

2.5.1 Deskripsi



Gambar 2.10 Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) (Nurjanah & Ihsan, 2013).

Klasifikasi ilmiah tanaman bengkuang adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Subfamili	: Faboideae
Genus	: <i>Pachyrhizus</i>
Spesies	: <i>P. erosus</i>
Nama binomial	: <i>Pachyrhizus erosus</i>

Pachyrhizus erosus berasal dari Amerika Tengah yang dikenal sebagai *xicama* atau *jicama*. *Jicama* adalah spesies dalam genus *Pachyrhizus* dan termasuk dalam famili polong-polongan (*Fabaceae*). Di Indonesia tanaman ini dikenal dengan sebutan bengkuang, besusu (Jawa), benkuang, bangkawang, beto, betok (Madura), sengkuang (Sumatera), bankawang, huwi hiris (Sunda) (Lim, 2016).

Tanaman bengkuang dapat tumbuh mencapai ketinggian 4-5 m. Akarnya dapat mencapai panjang 2 m dan berat hingga 2 kg. Akar bengkuang dapat dikonsumsi sedangkan biji bengkuang mengandung *rotenone* yang sangat beracun. 86-90% bengkuang terdiri dari air yang hanya mengandung sejumlah

kecil protein dan lipid. Rasa manisnya berasal dari inulin oligofruktosa sehingga cocok untuk penderita diabetes dan orang-orang dalam program diet (Lukitaningsih, 2009).

2.5.2 Potensi Fitoestrogen pada Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) biasanya dikonsumsi oleh masyarakat langsung dalam bentuk segar. Ekstrak bengkuang digunakan dalam industri kosmetik dalam produk pemutih, bedak padat, dan pelembab. Bengkuang mengandung senyawa isoflavon dengan komponen terbesarnya adalah genistein dan daidzein yang sering ditemukan dalam famili *Fabaceae*, termasuk *Pachyrhizus erosus*. Hasil penelitian oleh Lukitaningsih (2009) didapatkan 4 senyawa tergolong fitoestrogen pada umbi bengkuang yaitu daidzein, daidzein 7-O- β -glukopiranosida, 5-hydroxy-daidzein-7-O- β -glucopyranosa, dan (8,9)-furanlypterocarpan-3-ol.

Hasil analisis umbi bengkuang menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dihasilkan kadar daidzein 108,831 mg/100 g dan genistein 163,079 mg/100 g (Primiani, 2013). Penelitian lain hasil identifikasi kualitatif senyawa isoflavon pada ekstrak etanol bengkuang menggunakan metode *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) diperoleh kadar daidzein adalah 254 g/mol dan genistein adalah 270 g/mol (Sholihah, 2016). Isoflavon (daidzein dan genistein) pada *Pachyrhizus erosus* memiliki struktur mirip dengan 17 β -estradiol dan aktivitas seperti estrogen. Pemberian genistein dan daidzein dapat meningkatkan sekresi hormon estrogen. Kesamaan strukturnya menunjukkan kemampuan untuk mengikat reseptor estrogen sehingga mampu menimbulkan efek seperti estrogen endogen (Primiani, 2013).

2.5.3 Penelitian tentang Pengaruh Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Sistem Reproduksi

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Primiani (2015) dengan judul Potensi *Phytoestrogenic* dari *Yam Bean (Pachyrhizus erosus)* pada Struktur Jaringan Ovarium dan Uterus dari Tikus Premenopause menunjukkan pada pengamatan histologi ovarium menggunakan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE), pada ovarium tikus yang diberikan parutan umbi bengkuang dengan dosis 0,3 g/kg BB, terdapat beberapa folikel dengan lapisan tebal di bawah tunika albuginea. Ovum dikelilingi oleh lapisan sel folikel yang membentuk lapisan granula pada folikel yang lebih matang. Pada dosis 0,6 g/kg BB, terjadi pertumbuhan folikel sekunder, folikel lebih berbentuk telur (oval) dan telah bergerak menjauh dari korteks mendekati medula ovarium serta membentuk ruangan yang diisi dengan cairan (antrum) di sekitar sel telur dan lapisan sel granulosa yang melapisinya. Cairan yang disebut *liquor folliculi* ini membantu folikel berkembang menjadi folikel tersier yang tampak dari gambar ovarium yang diberi terapi parutan umbi bengkuang dengan dosis 0,9 g/kg. Selain itu, parutan umbi bengkuang yang diberikan kepada tikus dengan dosis 0,6 g/kg dan 0,9 g/kg dapat memicu proliferasi endometrium uterus dan lapisan miometrium serta meningkatkan jumlah kelenjar uterus.

Senyawa fitoestrogen dari *Pachyrhizus erosus* memiliki potensi estrogenik alami untuk wanita yang dibuktikan melalui penelitian dengan judul *Comparative Study of Effects Daidzein Contained in Yam Tuber (Pachyrhizus Erosus) and Pure Daidzein: The Dynamics of Chemical Compounds and Potential in Myometrium*. Hasilnya menunjukkan bahwa mekanisme senyawa fitoestrogen dari *Pachyrhizus erosus* pada serum, urin, dan uterus lebih dari senyawa sintetis. Pemberian terapi dengan umbi bengkuang secara signifikan meningkatkan proliferasi miometrium pada tikus. Sehingga diasumsikan bahwa

genistein dan *quercetin* merupakan senyawa estrogenik seperti yang ditemukan pada daidzein sehingga potensi di miometrium lebih efektif (Primiani *et al.*, 2013).

Pemberian parutan umbi bengkuang dapat mengoptimalkan sekresi hormon estrogen sehingga mampu menstimulasi perkembangan folikel primer (primordial), folikel sekunder, dan folikel tersier. Pemberian fitoestrogen selama periode pre-menopause juga dapat meningkatkan proliferasi endometrium dan sel epitel. Pertumbuhan miometrium dapat terjadi karena efek fitoestrogen dari bengkuang (Primiani, 2015).

Penurunan kadar estrogen selama periode pre-menopause dan pascamenopause mengakibatkan jumlah reseptor estrogen yang tidak terikat menjadi berlebihan. Hal yang sama juga terjadi pada pengguna kontrasepsi suntik DMPA, dimana kondisi hipoestrogen akan menyebabkan disfungsi ovarium dan menurunkan fungsi reproduksi karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium (Borecky *et al.*, 2009). Rendahnya kadar estradiol menyebabkan gangguan proses folikulogenesis akibat terhambatnya ovulasi. Folikel menjadi tidak dapat berkembang dan mengalami atresia karena terjadi apoptosis (Karuputhula *et al.*, 2012). Apoptosis dalam skala besar akan menyebabkan kerusakan jaringan yang ditandai dengan terhambatnya fungsi ovarium sehingga ovarium menjadi atrofi, tidak terjadi ovulasi, turunnya kadar estrogen dalam sirkulasi serta menurunkan fungsi reproduksi (Tasdemir *et al.*, 2009). Genistein dan daidzein memiliki kemampuan untuk mengikat reseptor estrogen yang disebut *sex hormone binding globulin* (SHBG) yang berfungsi untuk meningkatkan produksi hormon steroid dan bertanggung jawab untuk mengikat estrogen dan mengedarkannya melalui pembuluh darah (Setchell *et al.*, 1998).

Penurunan kadar estrogen endogen pada kondisi hipoestrogen akan menyebabkan tidak terjadinya fase estrus, sehingga pemberian bengkuang pada tikus dengan kondisi hipoestrogen dapat menstimulasi fase estrus. Genistein dan

daidzein sebagai fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen di ovarium dan uterus. Respon yang dihasilkan ketika kadar estrogen rendah adalah dengan pengikatan reseptor dan fitoestrogen akan membantu menyeimbangkan kadar estrogen. Fungsi estrogen dalam kaitannya dengan reproduksi menyebabkan proliferasi dan pertumbuhan jaringan di organ reproduksi (Primiani, 2015).

Penggunaan bahan alami sebagai terapi penggantian hormon pada wanita dengan kondisi hipoestrogen merupakan salah satu alternatif terapi. Komponen senyawa yang terkandung dalam bahan alami sangat kompleks dan dapat berinteraksi satu sama lain untuk memberikan efek fisiologis (Zhou *et al.*, 2003).

2.6 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)



Gambar 2.11 Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Keterangan: Tikus *Wistar* mempunyai ukuran kepala yang besar dan ekor lebih pendek. (Depkes RI, 2011).

Para peneliti sering kali menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) untuk pengujian medis karena tikus merupakan hewan pengerat berukuran kecil, mudah dipelihara, dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan baru. Tikus bereproduksi dengan cepat dan memiliki umur pendek, sekitar dua hingga tiga tahun. Tikus memiliki karakteristik genetik, biologis, dan perilaku menyerupai manusia sehingga kondisi pada manusia dapat direplikasi pada tikus untuk digunakan menjawab banyak pertanyaan penelitian (*National Research Council*, 2010).

2.6.1 Klasifikasi

Klasifikasi ilmiah dari *Rattus norvegicus* adalah sebagai berikut:

(Berkenhout, 1769)

- Kingdom : Animalia
- Divisi : Chordata
- Kelas : Mammalia
- Ordo : Rodentia
- Famili : Muridae
- Genus : *Rattus*
- Spesies : *R. norvegicus*
- Nama binomial : *Rattus norvegicus*

2.6.2 Fisiologi Umum

Tabel 2.1 Fisiologi umum dari *Rattus norvegicus* (Sengupta, 2013).

Parameter	Keterangan
Keadaan fisik umum	
Suhu tubuh	37 °C
Laju pernafasan	75 - 115 kali/menit
Denyut jantung	260 - 400 kali/menit
Konsumsi air harian	10 - 12 ml/100 g BB
Konsumsi makanan harian	10 g/100 g BB
Jumlah anak	6 - 12
Berat lahir	5 g
Waktu penyapihan	21 hari
Usia kematangan seksual	7 minggu
Durasi pembiakan	12 - 16 bulan
Berat pejantan dewasa	450 - 550 g
Berat betina dewasa	250 - 300 g
Masa hidup	2,5 - 3,5 tahun
Parameter reproduksi	
Tikus jantan	
Usia kawin	8 - 10 minggu
Berat saat kawin	250 - 300 g
Tikus betina	
Usia kawin	8 - 10 minggu
Berat saat kawin	180 - 225 g
Lama siklus estrus	4 - 5 hari
Durasi siklus estrus	10 - 20 jam
Waktu ovulasi	8 - 11 jam setelah estrus

Usia menopause	15 – 18 bulan
Gestasi	
Waktu kawin	dekat titik tengah <i>dark cycle</i> sebelumnya
Sperma terdeteksi di vagina	hari ke-1
Waktu implantasi	akhir hari ke-5
Usia gestasi	21 – 23 hari
Keterangan: Fisiologi umum <i>Rattus norvegicus</i> berdasarkan keadaan fisik, reproduksi, dan gestasi.	

2.6.3 Relasi Usia Tikus dengan Usia Manusia

Tikus laboratorium (*Rattus norvegicus*) hidup sekitar 2-3,5 tahun (rata-rata 3 tahun), sementara usia harapan hidup manusia di seluruh dunia adalah 80 tahun dengan variasi di masing-masing negara sesuai dengan kondisi sosial ekonomi. Dari rentang hidup tikus dan manusia, maka relasi usia tikus dan usia manusia dapat dihitung sebagai berikut: (Quinn, 2005; Sengupta, 2011).

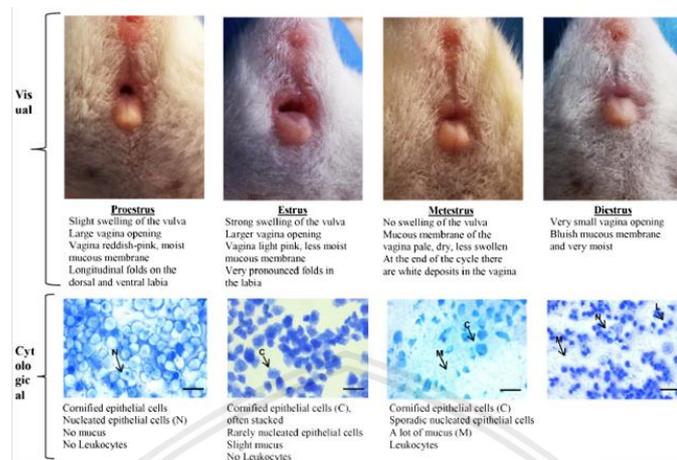
$$(80 \times 365) \div (3 \times 365) = 26,7 \text{ hari manusia} = 1 \text{ hari tikus}$$

$$365 \div 26,7 = 13,8 \text{ hari tikus} = 1 \text{ tahun manusia}$$

2.6.4 Siklus Reproduksi

Siklus estrus merupakan proses berulang yang menggambarkan perubahan dalam tingkat hormon reproduksi yang dipengaruhi mekanisme hormonal yaitu hubungan antara hormon-hormon hipotalamus-hipofisis (GnRH, LH, FSH), hormon-hormon ovarial (estradiol dan progesteron) dan hormon uterus (prostaglandin). Fase folikuler merupakan fase siklus yang singkat dimulai dari awal pembentukan folikel sampai pecahnya folikel matur saat ovulasi. Sedangkan fase luteal yang terjadi setelah ovulasi merupakan periode sekresi progesteron oleh korpus luteum meliputi lebih dari dua pertiga siklus estrus. Berdasarkan histologi vagina, siklus estrus pada tikus dibagi menjadi empat fase, yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Fase folikuler dimulai dengan proestrus yang diikuti oleh estrus dan ovulasi, sedangkan fase luteal terdiri atas

fase metestrus yang diikuti oleh diestrus dan diakhiri dengan luteolisis (Gulinello, 2016; Aritonang *et al.*, 2017).



Gambar 2.12 Empat tahap siklus estrus pada tikus setelah pemeriksaan visual vagina dan apusan vagina (sitologi) (Heykants & Mahabir, 2016).

Keterangan: Pembukaan vagina pada tikus proestrus ditandai oleh jaringan yang bengkak, lembab, dan berwarna merah muda. Pembukaannya lebar dan sering ada kerutan di sepanjang tepi dorsal dan ventral. Saat tikus memasuki estrus, pembukaan vagina menjadi merah muda pucat, kurang lembab, dan kurang bengkak. Metestrus ditandai dengan pembukaan vagina yang tidak terbuka lebar, tidak bengkak, dan debris dari sel putih dapat terlihat. Pada diestrus, bukaan vagina kecil dan tertutup tanpa pembengkakan jaringan (Byers *et al.*, 2012). Untuk pemeriksaan sitologi, ciri fase proestrus adalah adanya sel-sel epitel nuklear (N) yang bulat, pada fase estrus terdapat sel epitel yang *cornified*, dimana terlihat bersisik dan tidak memiliki inti (C), fase metestrus terdapat banyak lendir (M) dan fase diestrus terdapat adanya banyak leukosit (L) yang lebih kecil dan lebih gelap dari sel-sel epitel (Heykants & Mahabir, 2016).

Siklus estrus ditandai dengan perubahan morfologi pada ovarium, uterus, dan vagina yang terjadi selama fase yang berbeda. Fase-fase ini biasanya diidentifikasi berdasarkan jenis sel yang diamati dalam apusan vagina (Goldman *et al.*, 2007). Perubahan struktural dapat diamati pada epitel vagina tikus betina selama siklus estrus yang diinduksi oleh estrogen dan progesteron. Dengan demikian, vagina tikus dapat dianggap sebagai cermin fungsi ovarium yang menggambarkan aktivitas hormon seks (Paccola *et al.*, 2013).

Proestrus adalah fase dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel yang matang dibawah pengaruh FSH. Fase ini berlangsung 12 jam. Sistem reproduksi memulai persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium yang membuat sekresi

estrogen dalam darah semakin meningkat sehingga akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan saraf, disertai kelakuan birahi pada hewan. Saluran reproduksi termasuk mukosa vagina mulai mendapatkan vaskularisasi yang lebih intensif sehingga sel-sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi. Pada fase proestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau bertumpuk (berlapis-lapis) jika dilihat dengan menggunakan metode apusan vagina (Koebele & Bimonte-Nelson, 2016; Aritonang *et al.*, 2017).

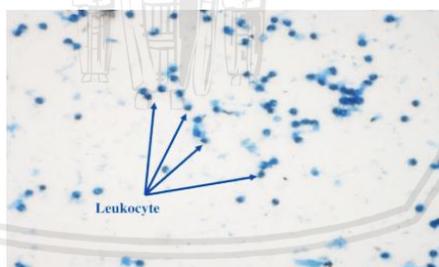
Fase proestrus kemudian diikuti oleh fase estrus. Pada fase ini hewan betina mau menerima pejantan untuk kopulas yang menjadi ciri khas dari estrus. Fase estrus dapat diketahui dengan adanya sel-sel tanduk yang banyak pada lumen vagina yang biasanya nampak pada preparat apusan vagina dan berlangsung selama 12 jam. Pembelahan dan proses penandukan (kornifikasi) epitel vagina tergantung dari meningkatnya kadar estrogen dalam tubuh sehubungan dengan akhir periode pertumbuhan folikel. Proses estrus sangat erat kaitannya dengan mekanisme sistem hormonal. Pada fase estrus, estrogen meningkatkan sensitivitas sel-sel penghasil gonadotropin pada hipofisa sehingga menghasilkan LH yang dapat menyebabkan ovulasi ketika kadar LH mencapai puncak. Pada saat estrus konsentrasi estrogen meningkat sesuai dengan pertumbuhan folikel *de Graaf*, dan selanjutnya di bawah pengaruh serta peran LH yang disekresikan dari hipofisis anterior terjadilah ovulasi dan pembentukan corpus luteum. Ovulasi terjadi pada akhir estrus dalam waktu yang sangat singkat. Setelah ovulasi terjadi, pada ovarium akan mengalami fase luteal, fase luteal adalah fase pembentukan corpus luteum yang dapat menghasilkan progesteron, sedangkan pada vagina terjadi fase metestrus dan diestrus. Pada waktu corpus luteum telah mencapai ukuran maksimal dan fungsional akan terjadi peningkatan konsentrasi progesteron (Hafez *et al.*, 2000).

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus. Saat fase ini corpus luteum tumbuh lebih cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan *adenohypophysis*. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh corpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH oleh *adenohypophysis* sehingga menghambat pembentukan folikel *de graaf* yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Diestrus adalah periode terakhir dan terlama siklus birahi pada hewan. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Pada fase metestrus dan diestrus, uterus mengalami fase sekretoris. Pada fase ini, ovarium mengandung corpora lutea dan folikel-folikel kecil. Fase metestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel tanduk dan sel-sel leukosit jika dilihat dengan menggunakan metode apusan vagina. Selama metestrus, uterus menjadi agak lunak karena terjadi pengendoran otot serta melakukan persiapan untuk menerima dan memberi nutrisi embrio (Koebele & Bimonte-Nelson, 2016).

Pelepasan epitel dan penyusunan leukosit terjadi bila kadar estrogen menurun dan bila pengaruh estrogen menghilang epitel vagina kembali dalam keadaan inaktif. Kondisi demikian disebabkan oleh banyaknya pembelahan mitosis yang terjadi di dalam mukosa vagina dan sel-sel baru yang menumpuk, sementara lapisan permukaan memiliki bentuk skuamosa dan bertanduk. Sel-sel bertanduk ini terkelupas ke dalam lumen vagina. Fase diestrus adalah fase setelah metestrus. Fase ini merupakan fase terpanjang diantara fase-fase siklus estrus lainnya. Fase diestrus berlangsung selama 60-70 jam. Pada fase ini kontraksi uterus menurun, endometrium menebal dan kelenjar-kelenjar mengalami hipertropi, serta mukosa vagina menipis, warna lebih pucat dan leukosit yang bermigrasi semakin banyak. Gambaran ulsan vagina pada fase ini menunjukkan leukosit dalam jumlah yang banyak (Gal *et al.*, 2014).

2.6.5 Pemeriksaan Apusan Vagina

Evaluasi mikroskopis dari jenis sel yang ada dalam apusan vagina telah lama digunakan untuk mendokumentasikan tahapan siklus estrus pada tikus laboratorium dan sebagai indeks status fungsional dari aksis hipotalamus-pituitari-ovarium. Dengan demikian, penilaian siklus estrus telah digunakan baik sebagai ukuran utama dalam penentuan siklus reproduksi. Metode *vaginal smear* lebih banyak digunakan karena dapat menunjukkan hasil yang lebih akurat. Metode ini menggunakan sel epitel dan leukosit sebagai bahan identifikasi. Sel epitel merupakan sel yang terletak di permukaan vagina, sehingga apabila terjadi perubahan kadar estrogen maka sel epitel merupakan sel yang paling awal terkena akibat dari perubahan tersebut. Leukosit merupakan sel antibodi yang terdapat di seluruh bagian individu. *Vaginal smear* yang diambil berturut-turut selama periode waktu tertentu dapat memberikan informasi rinci tentang siklus estrus. Tahapan siklus sel vagina biasanya akan berkorelasi dengan perubahan pada organ reproduksi, misalnya ovarium dan uterus (Cora *et al.*, 2015).



Gambar 2.13 Hasil *vaginal smear* pada tikus yang diovariectomi (Parhizkar *et al.*, 2011).

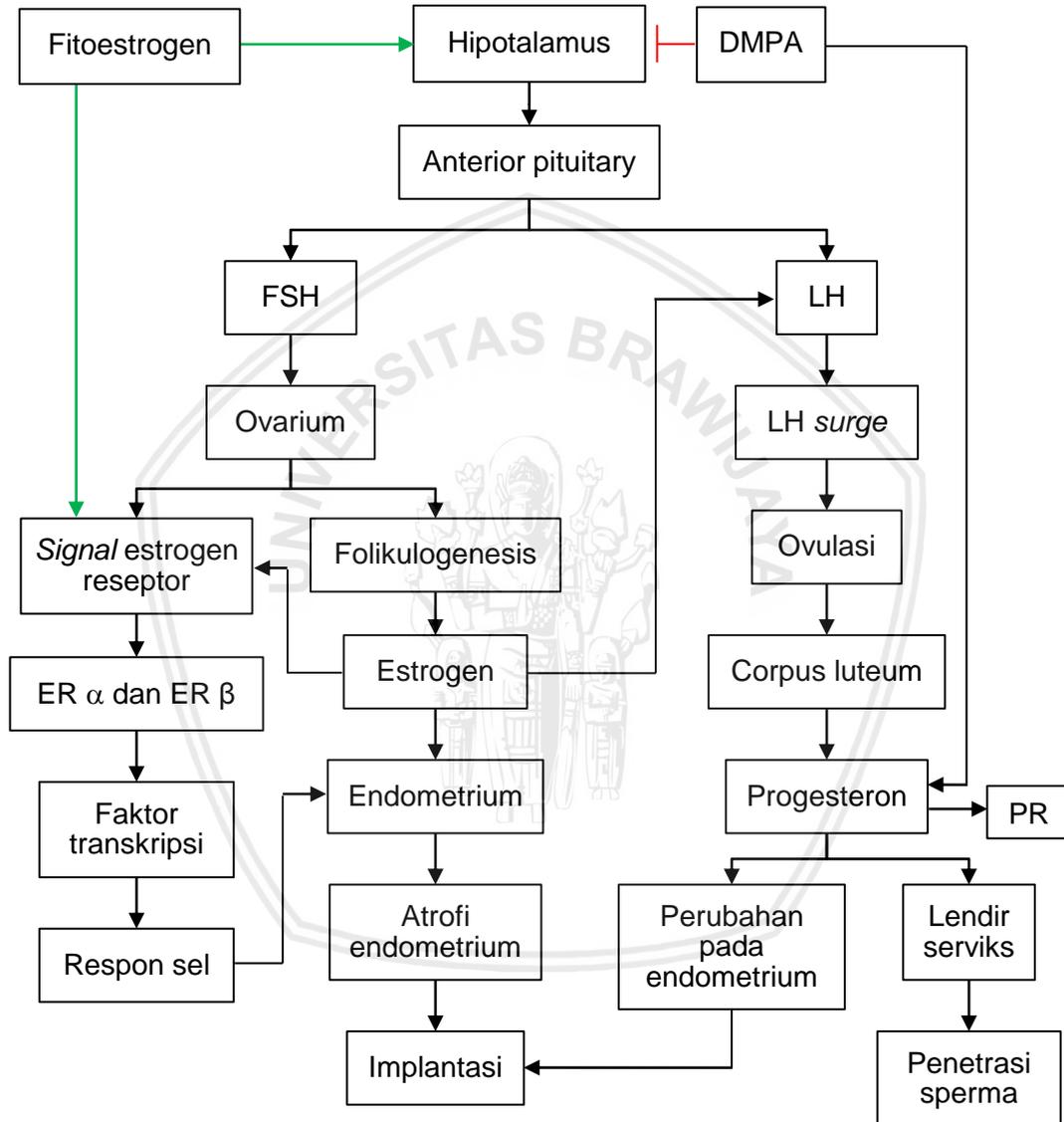
Keterangan: Apusan vagina dengan ovariectomi pada tikus menunjukkan jumlah leukosit yang banyak pada pewarnaan dengan *methylene blue* pada pembesaran 400 kali (Parhizkar *et al.*, 2011).

Tanpa adanya produksi estrogen selama siklus estrus, epitel tidak berkembang biak dan bertambah besar ukurannya. Apusan vagina tikus yang diovariectomi memiliki jumlah leukosit yang banyak karena leukosit berpindah dari epitel yang berkurang ke dalam vagina (Hubscher *et al.*, 2005).

BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Keterangan :

┤: menghambat (pengaruh DMPA)

↓: pengaruh fitoestrogen

↓: mempengaruhi

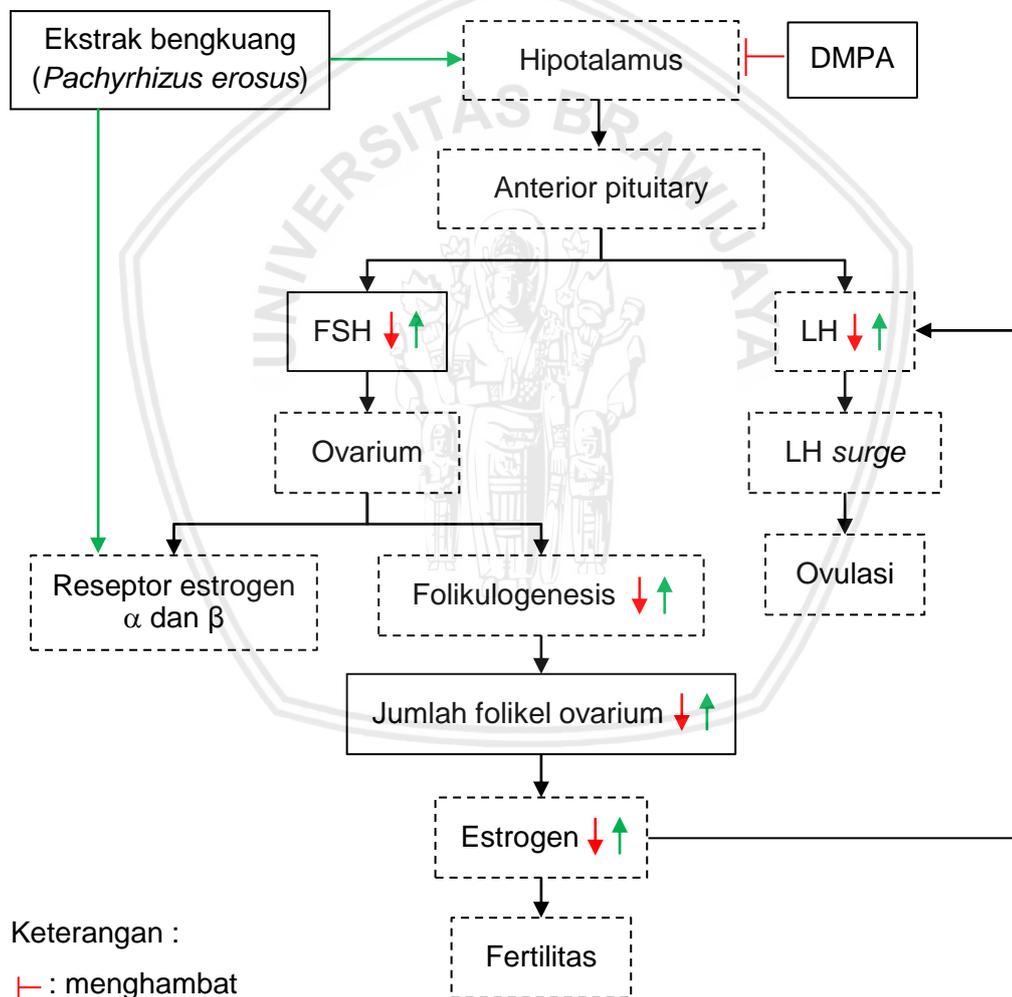
Gambar 3.1 Kerangka Teori

Depot Medroxyprogesterone Acetate (DMPA) merupakan kontrasepsi hormonal berisi progestin sintesis yaitu *17-acetoxypogesterone* yang akan dengan cepat masuk ke sirkulasi dalam tubuh dan dimetabolisme setelah diinjeksikan (Shoupe & Kjos, 2006). Cara kerja DMPA adalah mencegah terjadinya ovulasi, meningkatkan viskositas lendir serviks, dan menipiskan endometrium. Setelah di injeksikan, progesteron dari kontrasepsi DMPA akan menyebabkan terjadinya umpan balik negatif pada *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH), sehingga pelepasan hormon gonadotropin dihambat. Inhibisi pelepasan GnRH menstimulasi pelepasan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) dari hipofisis anterior dalam kadar yang rendah. Kadar FSH yang rendah akan mengakibatkan penurunan produksi estrogen pada sistem reproduksi sehingga mengakibatkan terganggunya fungsi ovarium dengan terhambatnya perkembangan follikel. Kadar estrogen yang rendah mengakibatkan efek umpan balik pada hipofise tidak dapat memproduksi LH yang cukup untuk merangsang terjadinya lonjakan LH (*LH surge*) (Baziad, 2002; Speroff & Darney, 2010). Akibat tidak terjadinya *LH surge*, ovulasi tidak dapat terjadi akibat tidak adanya telur yang matang karena gangguan folikulogenesis. Hal ini berlanjut dengan tidak terbentuknya corpus luteum dan hormon estrogen alami dalam tubuh tidak dapat diproduksi. Progesteron dari DMPA merangsang terjadinya perubahan pada endometrium dan lendir serviks untuk mencegah terjadinya kehamilan.

Fitoestrogen memiliki struktur kimia menyerupai estrogen endogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Fitoestrogen memberikan efeknya melalui berbagai mekanisme, yaitu berinteraksi dengan ER- α dan ER- β . Fitoestrogen memiliki afinitas yang lebih tinggi untuk ER- β daripada untuk ER- α . Selain berinteraksi dengan ER, fitoestrogen juga dapat memodulasi konsentrasi estrogen endogen dengan cara mengikat atau menonaktifkan beberapa enzim.

Konsentrasi yang diperlukan isoflavon untuk menginduksi aktivitas transkripsi adalah 10^4 lebih tinggi dari E2. Saat kadar estrogen tinggi, isoflavon bertindak sebagai antagonis estrogenik, sedangkan jika kadar estrogen rendah sebagai agonis lemah (Retana-Marquez *et al.*, 2012). Paparan fitoestrogen pada wanita pengguna kontrasepsi suntik diharapkan dapat mencegah kerugian yang disebabkan oleh penurunan produksi estrogen endogen.

3.2 Kerangka Konsep



Keterangan :

┃ : menghambat

↓ : pengaruh DMPA

↑ : pengaruh ekstrak bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

┃ : diteliti

□ : tidak diteliti

Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina akan dipapar injeksi DMPA setiap 3 hari dan diulang 4 kali yang disesuaikan dengan dosis pada manusia selama satu tahun. Mekanisme kerja DMPA adalah menekan fungsi hipotalamus sehingga menghambat pelepasan FSH dan LH. FSH bekerja di ovarium dengan menstimulasi folikulogenesis dan menstimulasi sel granulosa untuk menghasilkan enzim aromatase yang berfungsi merubah androgen yang dihasilkan oleh sel teka menjadi estradiol. Setelah tingkat estradiol sirkulasi meningkat, estradiol menyebabkan pelepasan LH dan FSH secara tiba-tiba yang kemudian menyebabkan ovulasi. Setelah ovulasi terjadi, peran FSH sangat berkurang dan pembentukan korpus luteum serta pemeliharaan endometrium uterus berada di bawah pengaruh LH (Santi *et al.*, 2018). Paparan progesteron sintetik meningkatkan kadar progesteron dalam tubuh sehingga kadar estradiol endogen menjadi rendah. Penggunaan DMPA dalam waktu lama akan menurunkan kadar estrogen dalam tubuh sehingga membutuhkan waktu untuk pemulihan siklus hormonal alami dalam tubuh (Haider & Darney, 2007).

Pemakaian kontrasepsi suntik DMPA menyebabkan tubuh dalam keadaan hipoestrogen sehingga mengakibatkan disfungsi ovarium dan menurunkan fungsi reproduksi karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium, folikel menjadi tidak dapat berkembang dan mengalami atresia karena terjadi apoptosis (Borecky *et al.*, 2009). Apoptosis dalam skala besar akan menyebabkan kerusakan jaringan yang ditandai dengan terhambatnya fungsi ovarium sehingga ovarium menjadi atrofi, tidak terjadi ovulasi, turunnya kadar estrogen dalam sirkulasi serta menurunkan fungsi reproduksi (Tasdemir *et al.*, 2009).

Kondisi hipoestrogen pada pengguna DMPA merupakan penyebab terhambatnya fungsi ovarium, maka secara logis terapi estrogen dapat mencegah kerugian yang ditimbulkan akibat penggunaan kontrasepsi DMPA.

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) diketahui mengandung senyawa isoflavon dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen yang mampu menimbulkan efek seperti estrogen endogen (Lukitaningsih, 2009). Fitoestrogen dapat berikatan reseptor estrogen yang terdapat dalam jaringan, misalnya pada sistem saraf pusat (termasuk hipotalamus-*hypophysial axis*). Hal ini menunjukkan bahwa fitoestrogen dapat memberikan efek hormonal spesifik pada jaringan (Sirotkin & Harrath, 2014). Adanya efek estrogenik dari ekstrak bengkuang diharapkan mampu memberikan efek seperti estrogen endogen sehingga dapat memperbaiki kondisi hipoestrogen dalam tubuh dengan cara meningkatkan sekresi hormon estrogen. Fungsi estrogen dalam kaitannya dengan reproduksi dapat menyebabkan proliferasi dan pertumbuhan jaringan di organ reproduksi. Pemberian ekstrak bengkuang diharapkan dapat meminimalkan efek samping dari penggunaan DMPA serta dapat mempercepat pemulihan untuk kesuburan wanita.

3.3 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.
2. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental* (eksperimental sesungguhnya) dengan desain *post test only control group design* yang dikerjakan di laboratorium dengan *in vivo*. Syarat rancangan eksperimental yaitu ada kelompok kontrol, ada random, dan ada replikasi (Zainuddin, 2011). Dalam penelitian ini perlakuan atau intervensi dari peneliti adalah pemberian suntikan *Depot-medroxyprogesterone acetate* (DMPA) kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) berbagai dosis terhadap tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sedangkan kondisi yang terjadi setelah perlakuan yang hanya diamati setelah perlakuan/intervensi dalam penelitian ini adalah kadar *follicle stimulating hormone* (FSH) dan jumlah folikel antral.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Kriteria Pengambilan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus putih dipilih karena memiliki karakteristik genetik, biologis, dan perilaku yang mirip dengan manusia, serta banyak gejala kondisi manusia dapat direplikasi pada tikus. Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan *systematic random sampling* yang berdasarkan kriteria inklusi.

4.2.2 Replikasi

Untuk menghitung jumlah replikasi pada penelitian *experimental* secara sederhana digunakan rumus Federer (1983) seperti berikut ini: (Prihanti, 2016).

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

t : jumlah perlakuan

r : jumlah replikasi

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus di atas, peneliti menetapkan 5 kelompok perlakuan sehingga didapatkan jumlah sampel hewan coba untuk tiap kelompok sebanyak 5 ekor tikus. Jadi, besar sampel dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus.

Untuk mengantisipasi kemungkinan hewan coba mati pada kelompok penelitian, maka dilakukan koreksi dengan $1 / (1 - f)$, dimana f adalah proporsi sampel yang hilang sebesar 10% (Lameshow & Lwanga, 1990). Berdasarkan rumus tersebut didapatkan jumlah replikasi $1 / (1 - 0,1) = 1.11 \approx 1$. Sehingga pada kelompok penelitian masing-masing ditambahkan 1 ekor tikus.

4.2.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

- a. Jenis kelamin betina
- b. Usia 8 – 10 minggu
- c. Berat badan 160 – 250 gram
- d. Kondisi sehat dan bergerak aktif

2. Kriteria Eksklusi

- a. Tikus bunting
- b. Tikus tampak sakit sebelum dan saat perlakuan (gerak tidak aktif)
- c. Tikus tidak mau makan dan minum yang disediakan
- d. Tikus mati selama penelitian

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, pemberian perlakuan, dan pembedahan hewan coba,

di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeriksaan kadar FSH, di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeriksaan jumlah folikel antral, dan di UPT Materia Medica Kota Batu untuk pembuatan ekstrak bengkuang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari – April 2019.

4.4 Bahan dan Alat

Penelitian ini akan menggunakan sampel sebanyak 25 ekor tikus betina galur *Wistar* yang sehat dengan umur 8-10 minggu dan berat 160-250 gram yang diperoleh dari UD. Abadi Jaya Peternakan Hewan Coba Yogyakarta. Hewan coba diinjeksikan dengan DMPA dengan merk dagang *Depo-Provera*[®]. Injeksi dilakukan dengan menggunakan jarum ukuran 27G.

Bahan ekstrak menggunakan bengkuang yang didapatkan dari Kecamatan Kayen Kidul, Kabupaten Kediri, Jawa Timur. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak bengkuang diberikan ke tikus dengan menggunakan sonde oral.

Pengukuran parameter untuk kadar FSH menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit for Follicle Stimulating Hormone (FSH)* untuk spesies *Rattus norvegicus* merk *Cloud-Clone Corp.* dengan *catalog number* CEA830Ra. Sedangkan untuk penghitungan jumlah folikel pada ovarium dilakukan pewarnaan dengan *Haematoxylin Eosin (HE)* menggunakan *Dotslide Microscope Olympus XC 10*.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel *Independent* (Bebas)

1. Pemberian suntikan *Depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA)*
2. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

4.5.2 Variabel *Dependent* (Tergantung)

1. Kadar *follicle stimulating hormone* (FSH)
2. Jumlah folikel antral

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Data	Satuan
DMPA	<i>Depot Medroxyprogesterone Acetat</i> adalah obat kontrasepsi suntik hormonal 3 bulan yang berisi 150 mg hormon progesteron sintetik yang disuntikkan ke tikus secara intramuskular pada otot <i>quadriceps</i> dengan dosis 0,18 ml (2,7 mg) setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali penyuntikan. Pemberian dosis disesuaikan dengan pemberian DMPA pada wanita setiap 3 bulan selama 1 tahun.	Nominal	mL
Ekstrak bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	Ekstrak bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>) diperoleh dari bengkuang varietas lokal yang didapat dari Kecamatan Kayen Kidul, Kabupaten Kediri, Jawa Timur lalu diproses dengan metode maserasi dalam pelarut ethanol 96%. Ekstrak bengkuang diberikan dalam dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg mg/200 g BB, dan 280 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari dengan dilarutkan pada 1 cc air dan dimasukkan menggunakan sonde.	Nominal	mg/200 g BB/hari
Kadar FSH	Kadar FSH dalam darah yang diambil secara intrakardial dengan keadaan jantung masih berdenyut. Darah diambil ± 3 ml melalui spuit dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa diberi antikoagulan yang kemudian dianalisis dengan metode ELISA.	Rasio	ng/mL
Jumlah folikel antral	Penghitungan jumlah folikel pada ovarium kanan dan kiri yang dipotong secara melintang kemudian dibuat <i>slide</i> histopatologi dan dilakukan pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE). Folikel yang dihitung adalah folikel antral, yaitu folikel yang terdiri dari oosit yang lebih berkembang dan dikelilingi oleh zona pelusida, dua hingga delapan lapisan sel kolumnar granulosa, dan lapisan teka yang menempel pada lamina basal serta terdapat cairan yang menumpuk diantara sel-sel folikular (antrum) dan folikel dengan antrum yang besar dan sel granulosa semakin tipis. Jumlah folikel dihitung	Rasio	Folikel/ ovarium

	menggunakan <i>Dotslide Microscope Olympus XC 10</i> pada keseluruhan penampang atau semua folikel yang ada pada seluruh penampang ovarium dan diidentifikasi lebih lanjut dengan pembesaran 400 kali.		
<i>Rattus norvegicus</i>	Hewan yang berkembang biak dengan cepat, ukuran tubuh lebih besar, dan bertahan cukup baik pada perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan <i>Rattus norvegicus</i> galur <i>Wistar</i> .	-	-
Hipoestrogen	Kondisi dimana kadar estrogen dalam tubuh lebih rendah dari batas normal. Pada tikus setelah pemaparan DMPA yang dinilai dengan melakukan apusan vagina (<i>vaginal smear</i>). Hipoestrogen pada tikus ditandai dengan adanya leukosit, tidak adanya sel kornifikasi, dan atrofi pada epitel vagina.	-	-

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

1. Aklimatisasi

Dilakukan selama 1 minggu untuk proses adaptasi tikus terhadap suasana laboratorium dan menghilangkan stres. Tikus diberikan makan dan minum sesuai dengan standar dan ditempatkan dalam kandang dengan suhu kamar (20-25 °C) dengan ukuran 25 x 35 x 40 cm yang dialasi sekam padi setebal 0,5-1 cm. Sekam dibersihkan dan diganti setiap 2 hari sekali.

2. Pemeriksaan apusan vagina

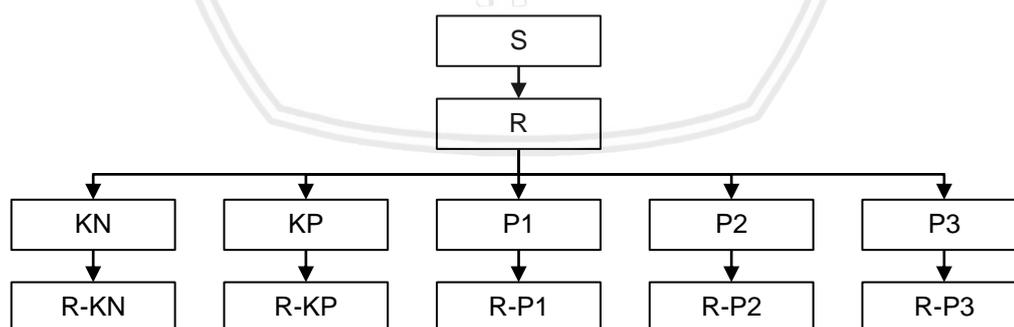
Apusan vagina bertujuan untuk menentukan fase estrus pada tikus. Hal ini dilakukan pada awal penelitian sebagai penanda tikus mulai dilakukan perlakuan dan hari terakhir waktu penelitian saat fase proestrus. Pemeriksaan apusan vagina dilakukan dengan menggunakan *cotton bud* yang direndam *aquadest* sesaat sebelum digunakan. *Cotton bud* dimasukkan ke dalam vagina dan diputar 360°. Hasil apusan dioleskan pada *object glass* dan disemprot alkohol 70% dan dikeringkan.

Setelah kering selanjutnya dilakukan pewarnaan *methelyn blue* selama 5-10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan sebelum diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Pada awal penelitian, tikus yang sudah memasuki fase estrus akan diberikan perlakuan sesuai dengan kelompok penelitian. Bagi tikus yang belum memasuki masa estrus akan ditunggu dan dilakukan pemeriksaan apusan vagina ulang untuk menentukan fase estrus. Fase estrus ditandai dengan adanya sel epitel yang *cornified*, dimana terlihat bersisik dan tidak memiliki inti. Sementara pada fase proestrus ditandai dengan adanya sel-sel epitel nuklear yang bulat (McLean *et al.*, 2012).

Tikus dibedah pada fase proestrus dikarenakan konsentrasi FSH cenderung lebih tinggi selama proestrus dan proses folikulogenesis terjadi pada fase ini, sehingga diharapkan dapat mendukung hasil penelitian yang akan dilakukan (Marcondes *et al.*, 2002; Koebele & Bimonte-Nelson, 2016).

4.7.2 Pembagian Kelompok Penelitian



Gambar 4.1 Kelompok penelitian

Keterangan:

- S : Sampel penelitian tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- R : Randomisasi
- KN : Kelompok kontrol negatif
- KP : Kelompok kontrol positif
- P1 : Kelompok perlakuan 1
- P2 : Kelompok perlakuan 2
- P3 : Kelompok perlakuan 3
- R-KN : Hasil pemeriksaan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada kelompok kontrol negatif

- R-KP : Hasil pemeriksaan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada kelompok kontrol positif
- R-P1 : Hasil pemeriksaan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada kelompok perlakuan 1
- R-P2 : Hasil pemeriksaan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada kelompok perlakuan 2
- R-P3 : Hasil pemeriksaan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada kelompok perlakuan 3

Sebanyak 25 tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Wistar* yang memenuhi kriteria inklusi dibagi menjadi 2 kelompok kontrol (kontrol negatif dan kontrol positif) dan 3 kelompok perlakuan (P1, P2, P3) yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 tikus. Pembagian tikus dalam kelompok dilakukan secara *random*.

1. Kelompok kontrol negatif (KN) : kelompok tikus yang diinjeksi *aquabidest* 0,18 ml setiap 3 hari sebanyak 4 kali tanpa dipapar DMPA dan tidak diberi ekstrak bengkuang.
2. Kelompok kontrol positif (KP) : kelompok tikus yang hanya dipapar DMPA dengan dosis 0,18 ml (2,7 mg) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan tanpa diberi ekstrak bengkuang.
3. Kelompok perlakuan 1 (P1) : kelompok tikus yang dipapar DMPA dengan dosis 0,18 ml (2,7 mg) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan diberi ekstrak bengkuang dosis 70 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari.
4. Kelompok perlakuan 2 (P2) : kelompok tikus yang dipapar DMPA dengan dosis 0,18 ml (2,7 mg) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan diberi ekstrak bengkuang dosis 140 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari.
5. Kelompok perlakuan 3 (P3) : kelompok tikus yang dipapar DMPA dengan dosis 0,18 ml (2,7 mg) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan

diberi ekstrak bengkuang dosis 280 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari.

4.7.3 Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Tikus putih diaklimatisasi selama 1 minggu dan dipelihara dalam laboratorium dan ditempatkan dalam kandang dengan suhu kamar (20-25 °C) dengan ukuran 20 x 30 x 40 cm yang dialasi sekam padi dan dibersihkan dan diganti setiap 2 hari sekali, serta ditutup dengan kawat kasa. Masing-masing kandang terdiri dari 5 ekor tikus. Tikus diberi makan dengan porsi 40 g/hari/ekor secara *ad libitum*.

4.7.4 Prosedur Pembuatan Ekstrak Bengkuang

1. Pembuatan simplisia dan serbuk bengkuang

Proses dimulai dengan menyiapkan bengkuang yang telah dipanen kemudian dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan bagian tanaman yang baik, tidak rusak, berjamur atau kena penyakit. Memilih bagian yang dibutuhkan untuk pembuatan simplisia kemudian melakukan penimbangan hasil sortasi basah. Selanjutnya dilakukan pencucian hasil sortasi basah dengan air mengalir dan ditiriskan. Untuk mempercepat proses pengeringan dilakukan perajangan bengkuang dengan menggunakan pisau atau mesin perajang. Setelah dirajang, bengkuang dikeringkan menggunakan oven dengan suhu kurang dari 60 °C. Proses pengeringan dilakukan hingga kadar air maksimal 10% (cek dengan *moisture balance*).

Hasil pengeringan dilanjutkan dengan proses sortasi kering. Proses sortasi dilakukan dengan memilih simplisia yang memiliki kadar air maksimal 10%. Kemudian dilanjutkan dengan penggilingan simplisia menggunakan mesin penggiling kasar maupun halus. Serbuk simplisia

ditimbang dan dikemas dengan menambahkan *silica gel*, dan diberi label, kemudian disimpan dalam gudang dengan prinsip *fifo* dan *fefo* (Prosedur Pembuatan Simplisia dan Serbuk, *Materia Medica*).

2. Ekstraksi bengkuang

Pembuatan ekstrak bengkuang dilakukan dengan metode maserasi dalam pelarut ethanol 96%. Prosedur ekstraksi (metode maserasi) serbuk bengkuang adalah sebagai berikut:

- a. Menimbang serbuk simplisia sebanyak 50 gram
- b. Mengukur pelarut sebanyak 350 ml
- c. Memasukkan serbuk ke dalam toples, meratakan serbuk sambil menambahkan pelarut sebanyak 700 ml sampai terendam
- d. Mengaduk menggunakan batang pengaduk selama 0,5 jam. Menutup toples dengan rapat selama 24 jam (proses maserasi)
- e. Menyaring ekstrak cair menggunakan kain saring. Menampung filtrat dalam erlenmeyer
- f. Mengukur pelarut sebanyak 350 ml kembali
- g. Masukkan ampas ke dalam toples kembali dan menambahkan pelarut sebanyak 350 ml sampai terendam
- h. Mengaduk menggunakan *overhead stirrer* selama 1 jam. Menutup toples dengan rapat selama 24 jam (proses remaserasi 1)
- i. Mengulang prosedur e-h sekali lagi (proses remaserasi 2)
- j. Hasil filtrat proses maserasi dan remaserasi dijadikan satu dan dilakukan pengadukan
- k. Melakukan evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator*
- l. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan di oven selama 1 jam pada suhu 40 °C untuk optimalisasi tidak ada kandungan etanol lagi (Sudjadi, 1986).

4.7.5 Injeksi DMPA

DMPA diinjeksikan secara intramuskular di otot *quadriceps* pada masing-masing kelompok (KP, P1, P2, P3). Berdasarkan tabel rasio luas permukaan dari spesies laboratorium dan manusia oleh Paget & Barnes (1964) dalam Folb (2012), didapatkan nilai ekuivalensi dosis antara manusia dan tikus adalah 0,018. Dosis DMPA untuk tikus diperoleh dari hasil perhitungan $150 \text{ mg DMPA} \times 0,018 = 2,7 \text{ mg}$. Untuk mempermudah pemberian, sediaan DMPA 150 mg (3 ml) diencerkan dengan *aquabidest* sebanyak 7 ml sehingga diperoleh volume injeksi 0,18 ml (2,7 mg).

Injeksi DMPA dilakukan setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali penyuntikan, dengan asumsi 13,8 hari tikus sama dengan 1 tahun manusia dan 26,7 hari manusia sama dengan 1 hari tikus (Sengupta, 2013). Pemberian dosis DMPA ini sesuai dengan pemberian DMPA pada wanita setiap 3 bulan selama 1 tahun.

4.7.6 Menentukan Kondisi Hipoestrogen

Untuk pemeriksaan kondisi reproduksi dapat dilakukan dengan pemeriksaan apusan vagina. Fungsi ovarium dapat diketahui dengan melihat sel epitel vagina yang menggambarkan kondisi fungsional. Pemeriksaan apusan vagina dilakukan setelah pemberian suntikan DMPA dosis terakhir. Gambaran kondisi apusan vagina pada tikus hipoestrogen tampak epitel tidak berkembang dan bertambah besar ukurannya serta memiliki jumlah leukosit yang banyak. Kondisi ini menyerupai ketika fase diestrus (Hubscher *et al.*, 2005).

4.7.7 Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang

Pemberian ekstrak bengkuang pada berbagai dosis, yaitu dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg mg/200 g BB, dan 280 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari (Tunikasari, 2015). Penghitungan pemberian dosis ekstrak etanol

bengkuang terlampir (Lampiran 5). Pada wanita butuh waktu 4 sampai 6 bulan kadar DMPA menurun secara bertahap pada sirkulasi dan menghilang dalam kurun waktu 7 sampai 9 bulan (Strauss & Barbieri, 2013).

4.7.8 Prosedur Pengambilan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah selesai perlakuan pada saat fase proestrus dengan langkah berikut:

1. Menyiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, kloroform, formalin 10%, dan botol tertutup untuk hewan coba.
2. Tikus dikorbankan dengan cara dianestesi dengan memberikan ketamin 1% dengan dosis 0,1 ml dan ditambah *aquadest* 0,9 ml, diinjeksikan kemudian ditunggu hingga tikus tidak bergerak lagi.
3. Tikus yang sudah pingsan diletakkan pada alas papan dengan menggunakan paku payung yang ditancapkan pada keempat telapak kaki tikus.
4. Dinding *thorax* dibuka untuk mengambil darah secara intrakardial melalui ventrikel kanan jantung, darah yang diambil sebanyak 2-3 ml melalui spuit kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa diberi antikoagulan.
5. Tikus akan mati karena kehabisan darah dan selanjutnya membuka dinding perut.
6. Ovarium diambil dan dimasukkan ke dalam tabung untuk selanjutnya dilakukan pembuatan *slide* histopatologi dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE).

4.7.9 Pemeriksaan Kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH)

Pengukuran kadar FSH menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *Kit for Follicle Stimulating Hormone* (FSH) untuk spesies *Rattus norvegicus* merk *Cloud-Clone Corp.* dengan *catalog number* CEA830Ra.

1. Persiapkan semua reagen, sampel, dan standar;
2. Tambahkan 50 μL standar atau sampel ke setiap *well* dan kemudian segera tambahkan 50 μL Deteksi Reagen A. Kocok dan aduk. Inkubasi 1 jam pada suhu 37 °C;
3. Aspirasi dan cuci sebanyak 3 kali;
4. Tambahkan 100 μL Deteksi Reagen B yang telah disiapkan. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C;
5. Aspirasi dan cuci sebanyak 5 kali;
6. Tambahkan 90 μL *Substrate Solution*. Inkubasi selama 10-20 menit pada suhu 37 °C;
7. Tambahkan 50 μL *Stop Solution*. Langsung baca pada panjang gelombang 450 nm.

(*Instruction Manual ELISA Kit for FSH, Cloude-Clone Corp.*)

4.7.10 Prosedur Pembuatan Sediaan Histopatologis Ovarium

Sediaan histopatologis dibuat dengan metode parafin sesuai dengan pedoman penanganan bahan pemeriksaan untuk histopatologi dari Buku Pedoman Pelayanan Patologi Anatomi Indonesia tahun 2015.

1. Fiksasi (*fixation*)

Organ segar dipotong ± 3 cm, kemudian organ diletakkan dalam cairan formalin/PFA 4-10% dengan perbandingan 1:10 selama minimal 24 jam.

2. Dehidrasi (*dehydration*)

Menyiapkan kaset untuk setiap sampel organ, beri label, lalu dipotong ± 5 mm dan dimasukkan dalam kaset. Merendam kaset dalam air mengalir selama 30 menit lalu memindahkan kaset ke dalam larutan alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% secara berturut-turut, masing-masing selama 10 menit. Setelah itu dipindahkan ke dalam larutan

alkohol 99% sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Terakhir, memindahkan kaset ke dalam larutan alkohol 99% yang ketiga dan biarkan semalam (*overnight*).

3. Penjernihan (*clearing*)

Memindahkan kaset ke dalam larutan xilol sebanyak 2 kali masing-masing selama 20 menit. Apabila organ sudah cukup bening maka dilanjutkan ke tahap penempelan, jika belum jernih maka masukkan kaset ke dalam larutan xilol 3 selama 20 menit.

4. Penempelan (*embedding*)

Memindahkan kaset dalam paraffin cair dengan suhu ± 60 °C pada *embedding tissue console*, biarkan semalam, kemudian memasukkan organ dalam blok besi, isi dengan paraffin cair dan tempelkan pada sisi sebelah dalam kaset, lalu memindahkan blok besi dan kaset ke bagian dengan suhu ± 0 °C biarkan semalam (*overnight*).

5. Pemotongan (*sectioning*)

Memisahkan blok organ dengan blok besi, metakkan dalam penjepit *rotary microtome*, mengatur ketebalan pemotongan 5-10 μm , memindahkan pita paraffin ke dalam *waterbath* dengan suhu ± 50 °C sampai pita paraffin meregang, memindahkan pita paraffin ke *preclean slides/poly-L-Lycine slide*, metakkan slide di atas *hotplate* dengan suhu ± 44 °C biarkan semalam (*overnight*), terakhir memberi label sesuai sampel organ pada slide.

6. Pewarnaan (*staining*)

Slide yang telah kering dipindahkan ke rak preparat untuk proses pewarnaan, kemudian dimasukkan ke dalam larutan xilol selama 3 menit, lalu dipindahkan ke dalam larutan alkohol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% secara berturut-turut, masing-masing selama 30 detik. Memindahkan

rak preparat ke dalam air mengalir selama 1 menit, larutan *hematoxylin* selama 4 menit, air mengalir selama 1 menit, larutan *eosin* selama 90 detik, larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96% secara berturut-turut, masing-masing selama 30 detik, larutan xilol selama 3 menit, dan terakhir meletakkan rak preparat pada wadah terbuka.

7. Penutupan (*mounting*)

Mengambil slide preparat kemudian beri \pm 1-2 tetes *enthellan* pada potongan organ, tutup organ dengan *cover glass* dan biarkan hingga *enthellan* kering. Simpan dalam kotak preparat.

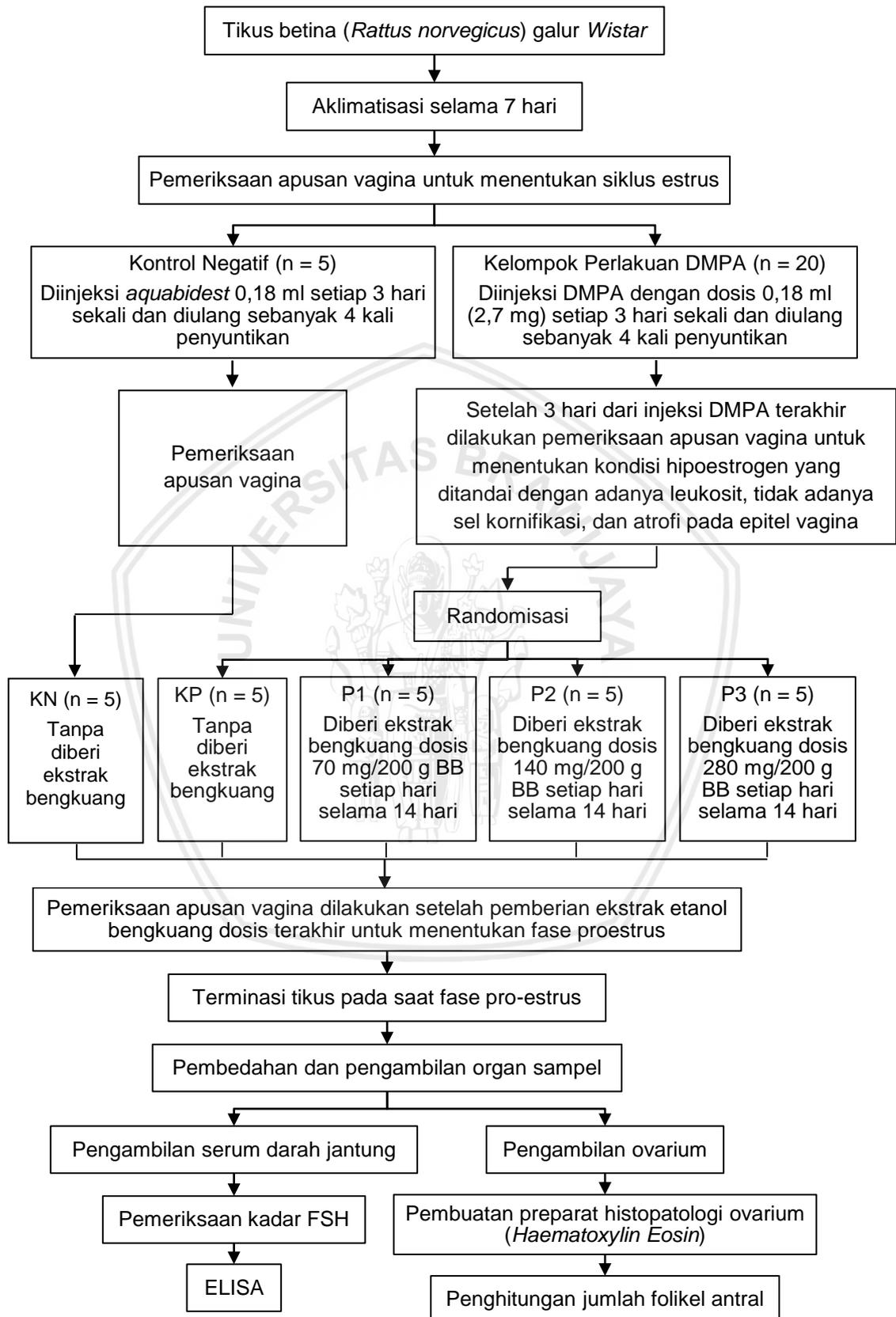
4.7.11 Prosedur Pengamatan Jumlah Folikel Antral

Jumlah folikel antral dihitung dengan *slide* histopatologi ovarium menggunakan *Dotslide Microscope Olympus XC 10* untuk penampang keseluruhan dan diidentifikasi lebih lanjut dengan pembesaran 400 kali lalu dilakukan penghitungan jumlah folikel antral.

4.7.12 Prosedur Pembuangan Hewan Coba

Setelah dilakukan pengambilan sampel darah dan jaringan ovarium, tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dikorbankan kemudian ditanam di tanah dengan kedalaman 0,5 m untuk menghindari pencemaran lingkungan (Bancroft, 2008).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis data pertama yang dilakukan adalah uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*. Pengujian ini digunakan untuk melihat normalitas data sebagai prasyarat menggunakan uji parametrik. Apabila hasil uji normalitas nilai *p value* > 0,05 maka distribusi data normal.

Uji hipotesa menggunakan *One Way Anova* (uji F) untuk membandingkan rerata variabel terukur pada lebih dari 2 kelompok sampel. Uji ini digunakan bila data berdistribusi normal, bila tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh perlakuan dari peneliti terhadap objek sampel penelitian. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) (Steel & Torrie, 1995). Tujuan digunakan uji *LSD* adalah untuk menemukan pada dosis berapa yang mempunyai pengaruh yang paling bermakna. Semua uji dilakukan dengan menggunakan *SPSS for Windows 24*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

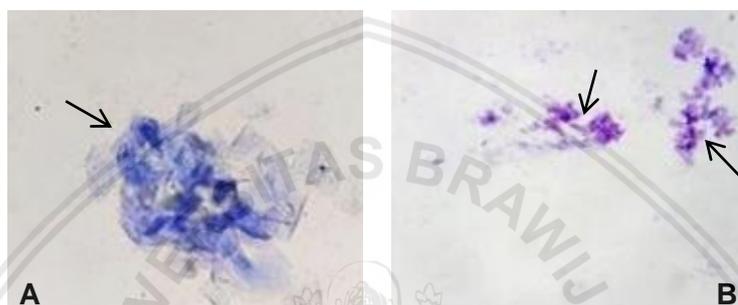
Penelitian ini dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan UPT Materia Medica Kota Batu pada bulan Februari – April 2019. Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental* dengan menggunakan desain *post test only control group design* dengan *in vivo* yang dikerjakan di laboratorium untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar FSH dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

5.1 Hasil Pengamatan Laboratorium

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi dibagi menjadi 5 kelompok, antara lain kelompok kontrol negatif (KN) adalah kelompok tikus yang tidak dipapar DMPA dan tidak diberi ekstrak etanol bengkuang, kelompok kontrol positif (KP) adalah kelompok tikus yang hanya dipapar DMPA tanpa diberi ekstrak etanol bengkuang, kelompok perlakuan 1 (P1) adalah kelompok tikus yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari, kelompok perlakuan 2 (P2) adalah kelompok tikus yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari, serta kelompok perlakuan 3 (P3) adalah kelompok tikus yang dipapar DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari.

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 1 minggu kemudian dilakukan pemeriksaan apusan vagina untuk menentukan

fase estrus. Tikus yang sudah memasuki fase estrus akan diberi paparan berupa suntikan DMPA dengan dosis 2,7 mg setiap 3 hari diulang sebanyak 4 kali, kecuali tikus pada kelompok kontrol negatif (KN). Pemberian suntikan DMPA ini bertujuan untuk menjadikan tikus sebagai hewan model hipoestrogen. Kondisi hipoestrogen dipastikan dengan pemeriksaan apusan vagina setelah injeksi DMPA dosis keempat. Gambaran apusan vagina sebelum dan sesudah dipapar DMPA dapat diamati pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 (A) hasil pemeriksaan apusan vagina pada tikus sebelum dipapar DMPA, (B) setelah dipapar DMPA.

Keterangan: (A) Gambaran apusan vagina pada tikus sebelum dipapar DMPA pada fase estrus. Estradiol yang berasal dari folikel yang matang akan menyebabkan perubahan pada saluran reproduksi. Fase estrus dapat diketahui dengan adanya sel-sel tanduk yang banyak pada lumen vagina. Pembelahan dan proses penandukan (kornifikasi) epitel vagina disebabkan karena meningkatnya kadar estrogen dalam tubuh sehubungan dengan akhir periode pertumbuhan folikel. Tanda panah menunjukkan adanya kelompok sel epitel skuamosa yang *cornified*, tidak ada nukleus yang terlihat, sitoplasma bersifat granular, dan bentuknya tidak beraturan. (B) Gambaran apusan vagina pada tikus setelah dipapar DMPA. Tanda panah menunjukkan adanya leukosit dan tidak adanya sel kornifikasi. Pelepasan epitel dan penyusunan leukosit terjadi ketika kadar estrogen menurun dan bila pengaruh estrogen menghilang epitel vagina kembali dalam keadaan inaktif. Kondisi demikian disebabkan oleh banyaknya pembelahan mitosis yang terjadi di dalam mukosa vagina dan sel-sel baru yang menumpuk.

Setelah pemberian DMPA dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol benguang (*Pachyrhizus erosus*) sesuai dengan dosis pada tiap kelompok perlakuan (P1, P2, P3), kecuali pada kelompok kontrol positif (KP) dan kelompok kontrol negatif (KN). Setelah pemberian ekstrak etanol benguang dosis terakhir dilakukan pemeriksaan apusan vagina untuk menentukan fase proestrus dan selanjutnya dilakukan pembedahan (Gambar 5.2).

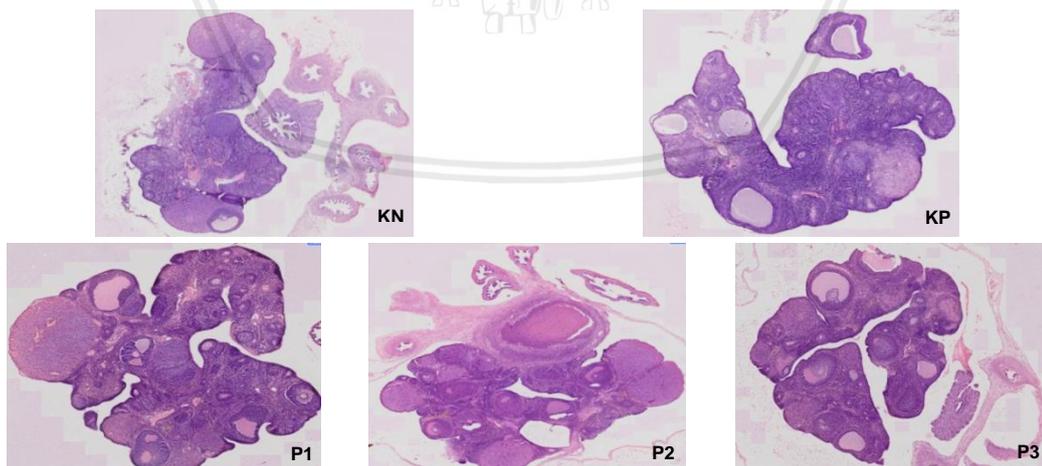


Gambar 5.2 Hasil pemeriksaan apusan vagina pada fase proestrus setelah pemberian ekstrak etanol bengkung (*Pachyrhizus erosus*).

Keterangan: Pada fase proestrus terjadi perkembangan folikel dibawah pengaruh FSH dan menghasilkan estrogen dalam jumlah banyak. Saluran reproduksi termasuk mukosa vagina mulai mendapatkan vaskularisasi yang lebih intensif sehingga sel-sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi. Gambaran hasil pemeriksaan apusan vagina ditandai dengan adanya dominasi sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau bertumpuk seperti yang ditunjuk oleh tanda panah.

Serum darah dari jantung diambil untuk pemeriksaan kadar FSH dengan menggunakan metode ELISA, sedangkan ovarium diambil untuk dilakukan pembuatan *slide* histopatologi dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) untuk selanjutnya dihitung jumlah folikel antral.

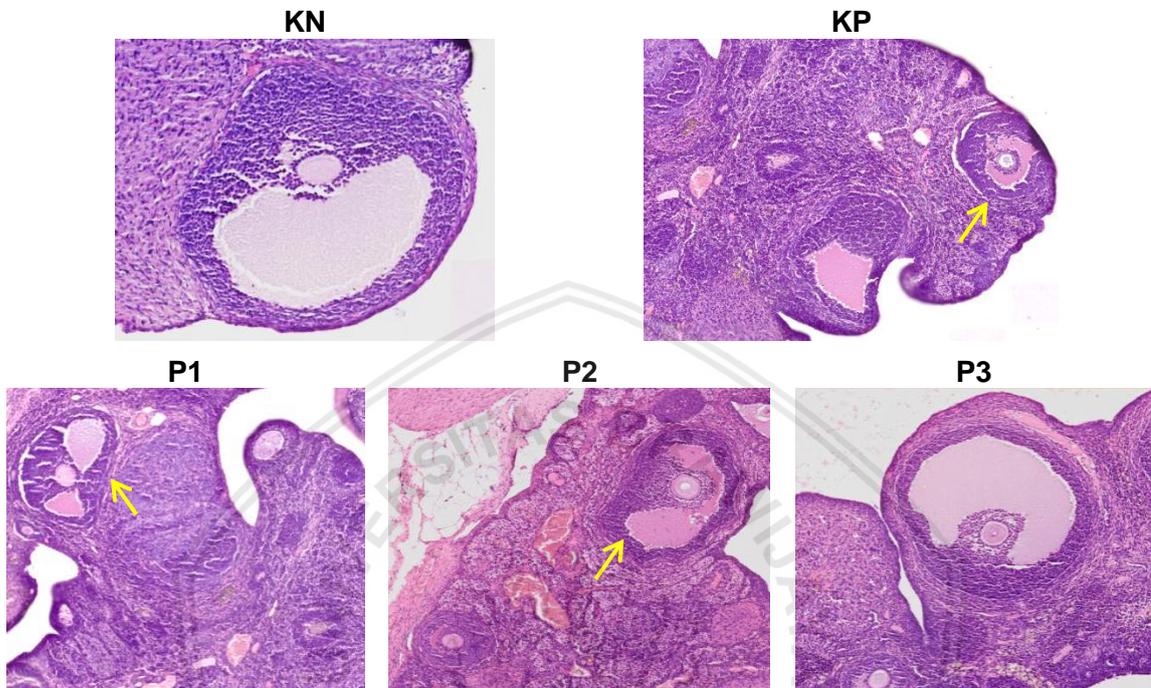
Hasil pengamatan mikroskopis folikel ovarium tikus pada masing-masing kelompok perlakuan dalam penelitian ini diawali dengan pembesaran 100 kali, namun belum dapat diamati jenis folikelnya seperti pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Gambaran mikroskopis irisan ovarium tikus dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE), pembesaran 100 kali.

Keterangan: KN : Kelompok kontrol negatif
 KP : Kelompok kontrol positif
 P1 : Kelompok perlakuan 1
 P2 : Kelompok perlakuan 2
 P3 : Kelompok perlakuan 3

Untuk menganalisis jenis folikel dan menghitung jumlah folikel antral dilakukan pengamatan dengan pembesaran 400 kali seperti tertera pada gambar di bawah ini.



Gambar 5.4 Gambaran mikroskopis folikel antral dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE), pembesaran 400 kali.

Keterangan: Terlihat pada gambar KP, P1 dan P2 yang ditunjuk tanda panah merupakan folikel antral dengan dua atau lebih lapis sel granulosa yang mengelilingi oosit dan sudah terbentuk antrum. Sedangkan pada gambar KN dan P3 merupakan folikel antral dengan inti sel yang mulai bergeser ke tepi, ukuran antrum lebih besar dan sel granulosa semakin tipis.

5.2 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Pada penelitian ini variabel kadar FSH dan jumlah folikel antral berskala data rasio, sehingga menggunakan analisis statistik parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian. Sebelum data dianalisis lebih lanjut, maka dilakukan analisis prasyarat parametrik terlebih dahulu untuk data dengan distribusi normal, namun jika distribusi data tidak normal maka menggunakan analisis statistik non-parametrik. Pada penelitian ini, uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Peneliti menetapkan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, bila *p-value* $> 0,05$, maka distribusi data dikatakan normal. Namun jika

$p\text{-value} < 0,05$ maka distribusi data tidak normal. Tabel 5.1 menjelaskan hasil analisis uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* (Lampiran 7).

Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas Data

Kelompok Pengamatan	<i>p-value</i>		Distribusi
	Kadar FSH	Jumlah Folikel Antral	
Kontrol (-)	0,255	0,421	Normal
Kontrol (+) (DMPA)	0,426	0,314	Normal
P1 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 70 mg/200 g BB/hari)	0,193	0,119	Normal
P2 (DMPA + Eks etanol bengkuang 140 mg/200 g BB/hari)	0,292	0,814	Normal
P3 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 280 mg/200 g BB/hari)	0,748	0,421	Normal

Keterangan : Jika $p\text{-value} < 0,05$ berarti data tidak berdistribusi normal dan jika $p\text{-value} > 0,05$ berarti data berdistribusi normal

Pada tabel 5.1 menunjukkan kadar FSH dan jumlah folikel antral pada tiap kelompok pengamatan menunjukkan nilai $p\text{-value}$ lebih besar dari 0,05 pada keseluruhan data. Maka, telah terbukti bahwa semua data terdistribusi normal dan memenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya, data dianalisis dengan uji statistika parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan pada bab 3 sebelumnya.

5.3 Hasil Uji Perbandingan Antar Kelompok Perlakuan

5.3.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Kadar FSH pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen dengan DMPA

Perbandingan rerata kadar FSH dengan *One Way Anova* pada kelimakelompok sampel pengamatan didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p\text{-value} = 0,000 < \alpha$ (Lampiran 8). Tabel 5.2 di bawah ini menunjukkan hasil uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*).

Tabel 5.2 Perbandingan Kadar FSH (ng/mL)

Kelompok Pengamatan	Rerata ± SD	p-value
Kontrol (-)	182,75 ± 19,49 ^a	0,000 < α
Kontrol (+) (DMPA)	47,59 ± 7,89 ^b	
P1 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 70 mg/200 g BB/hari)	66,26 ± 7,82 ^c	
P2 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 140 mg/200 g BB/hari)	80,47 ± 8,16 ^d	
P3 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 280 mg/200 g BB/hari)	102,96 ± 12,05 ^e	

Keterangan: Pada rerata ± SD menunjukkan hasil uji LSD, jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (*p-value* < 0,05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (*p-value* > 0,05).

Pada Tabel 5.2 dari hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar FSH antara kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian DMPA) (182,75 ± 19,4 ng/mL) dengan kelompok kontrol positif (diberi paparan DMPA) (47,59 ± 7,89 ng/mL). Tampak nilai rerata kadar FSH pada kelompok kontrol negatif jauh lebih besar bila dibandingkan dengan rerata kadar FSH pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan pemberian DMPA akan menunjukkan kadar FSH yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus yang tidak dipapar DMPA. Jadi, dapat dikatakan bahwa pemberian DMPA dapat berakibat terhadap penurunan kadar FSH.

Ada pula perbedaan yang bermakna rerata kadar FSH antara kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian DMPA) (182,75 ± 19,4 ng/mL) dengan kelompok P1 DMPA + pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari (66,26 ± 7,82 ng/mL), kelompok P2 DMPA + pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari (80,47 ± 8,16 ng/mL), dan juga kelompok P3 DMPA + pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari (102,96 ± 12,05 ng/mL).

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna rerata kadar FSH antara kelompok kontrol positif (47,59 ± 7,89 ng/mL) dengan kelompok P1 (66,26 ± 7,82 ng/mL). Tampak nilai rerata kadar FSH kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata kadar FSH pada kelompok P1. Hal ini berarti bahwa

dosis ekstrak etanol bengkuang 70 mg/200 g BB/hari akan meningkatkan kadar FSH bila dibandingkan dengan tikus yang diberi DMPA. Dengan kata lain, pemberian ekstrak etanol bengkuang 70 mg/200 g BB/hari akan berakibat terhadap peningkatan kadar FSH pada tikus yang diberi DMPA sebelumnya.

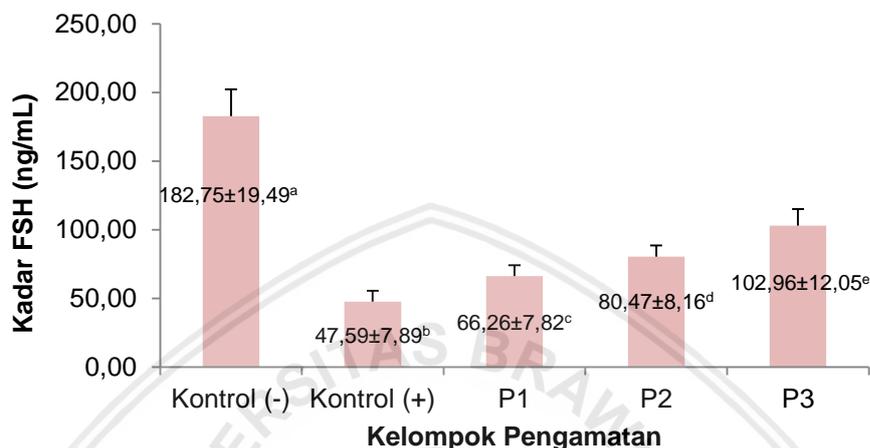
Demikian pula antara kelompok kontrol positif ($47,59 \pm 7,89$ ng/mL) dengan kelompok P2 ($80,47 \pm 8,16$ ng/mL) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar FSH. Pada nilai rerata kadar FSH kelompok kontrol positif menunjukkan nilai yang lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata kadar FSH pada kelompok P2. Hal ini berarti bahwa tikus hipoestrogen dengan DMPA yang diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari akan meningkatkan kadar FSH bila dibandingkan dengan tikus yang diberi DMPA. Jadi, dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang 140 mg/200 g BB/hari dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus yang diberi DMPA.

Hasil pada Tabel 5.2 menunjukkan pula bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar FSH antara kelompok kontrol positif ($47,59 \pm 7,89$ ng/mL) dengan kelompok P3 ($102,96 \pm 12,05$ ng/mL). Nilai rerata kadar FSH kelompok kontrol positif jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata kadar FSH pada kelompok P3. Hal ini dapat diartikan bahwa tikus hipoestrogen dengan DMPA yang diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari akan meningkatkan kadar FSH bila dibandingkan dengan tikus yang diberi DMPA. Dengan kata lain perlakuan pemberian ekstrak etanol bengkuang 280 mg/200 g BB/hari dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus yang diberi DMPA.

Pada penjelasan hasil dari Tabel 5.2 di atas, maka dapat diartikan bahwa perlakuan pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari, 140 mg/200 g BB/hari, dan 280 mg/200 g BB/hari pada tikus yang diberi DMPA berpengaruh bermakna terhadap peningkatan kadar FSH. Jadi hipotesis pertama terbukti, yaitu pemberian pemberian ekstrak etanol bengkuang

(*Pachyrhizus erosus* dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar DMPA.

Rerata kadar FSH pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



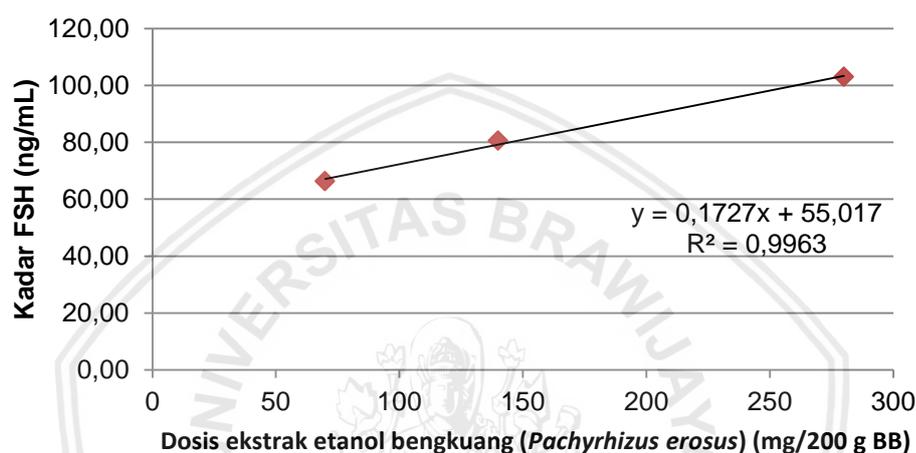
Gambar 5.5 Histogram Rerata Kadar FSH

Keterangan: Pada rerata \pm SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p -value $<$ 0,05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p -value $>$ 0,05).

Pada Gambar 5.5 menunjukkan histogram rerata kadar FSH pada tikus yang tidak dipapar DMPA (kontrol negatif), tikus yang dipapar DMPA (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus hipoestrogen yang diberi ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 70 mg/200 g BB (P1), dosis 140 mg/200 g BB (P2), dan dosis 280 mg/200 g BB (P3). Tampak rerata kadar FSH paling tinggi ada pada kelompok kontrol negatif dan yang paling rendah ada pada kelompok kontrol positif. Pemberian DMPA pada tikus mengakibatkan kadar FSH menurun. Sedangkan rerata kadar FSH tampak meningkat pada kelompok P1, P2, dan P3 daripada kelompok kontrol positif. Peningkatan kadar FSH seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol bengkuang yang diberikan. Jadi, pemberian ekstrak etanol bengkuang dalam 3 dosis tersebut dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus yang dipapar DMPA. Diantara ketiga dosis ekstrak etanol bengkuang, dosis 280

mg/200 g BB mampu meningkatkan kadar FSH dengan rerata yang paling tinggi ($102,96 \pm 12,05$ ng/mL).

Pada penelitian ini ingin mengetahui tingkat keeratan pengaruh antara dosis ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar FSH pada tikus yang dipapar DMPA. Adapun model persamaan regresi tersebut ditunjukkan pada Gambar 5.6 di bawah ini.



Gambar 5.6 Model Persamaan Garis Regresi Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Kadar FSH

Pada Gambar 5.6 memperlihatkan model persamaan garis regresi yaitu $y = 0,1727x + 55,017$, dengan X adalah dosis ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dan y adalah kadar FSH. Koefisien regresi positif 0,1727 menunjukkan pengaruh yang positif dosis ekstrak etanol bengkuang terhadap kadar FSH. Sedangkan besar prosentase pengaruh adalah $R^2 \times 100\% = 0,9963 \times 100\% = 99,63\%$. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) mampu mempengaruhi peningkatan kadar FSH sebesar 99,63%, sedangkan faktor yang lain di luar penelitian ini mempengaruhi sebesar 0,37%.

5.3.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen dengan DMPA

Hasil analisis jumlah folikel antral dengan uji *One Way Anova* data diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah folikel antral dengan nilai $p\text{-value} = 0,000 < \alpha$ (Lampiran 8). Tabel 5.3 di bawah ini menunjukkan hasil uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*).

Tabel 5.3 Perbandingan Jumlah Folikel Antral

Kelompok Pengamatan	Rerata \pm SD	$p\text{-value}$
Kontrol (-)	6,20 \pm 1,30 ^a	
Kontrol (+) (DMPA)	2,8 \pm 0,84 ^b	
P1 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 70 mg/200 g BB/hari)	4,0 \pm 1,00 ^b	0,000 $<$ α
P2 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 140 mg/200 g BB/hari)	4,6 \pm 1,14 ^{bc}	
P3 (DMPA + Eks. etanol bengkuang 280 mg/200 g BB/hari)	7,2 \pm 1,30 ^a	

Keterangan: Pada rerata \pm SD menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0,05$).

Pada Tabel 5.3 dari hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian DMPA) (6,20 \pm 1,30) dengan kelompok kontrol positif (diberi paparan DMPA) (2,80 \pm 0,84). Berdasarkan nilai reratanya jumlah folikel antral tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan nilai rerata jumlah folikel antral pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus yang diberi DMPA akan menunjukkan jumlah folikel antral yang sedikit bila dibandingkan dengan tikus yang tidak dipapar DMPA. Jadi, dapat dikatakan bahwa pemberian DMPA dapat berakibat terhadap penurunan jumlah folikel antral.

Ada pula perbedaan yang bermakna rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian DMPA) (6,20 \pm 1,30) dengan kelompok P1 DMPA + pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari (4,0 \pm 1,00) dan kelompok P2 DMPA + pemberian ekstrak etanol

bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari ($4,6 \pm 1,14$). Tetapi tidak berbeda bermakna rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol negatif (tanpa pemberian DMPA) ($6,20 \pm 1,30$) dengan kelompok P3 DMPA + pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari ($7,2 \pm 1,30$).

Pada Tabel 5.3 menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol positif ($2,8 \pm 0,84$) dengan kelompok P1 ($4,0 \pm 1,00$). Tikus hipoestrogen dengan DMPA yang diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari akan meningkatkan jumlah folikel antral bila dibandingkan dengan tikus yang diberi DMPA, meskipun peningkatan ini tidak bermakna secara statistik. Pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB/hari dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus yang diberi DMPA.

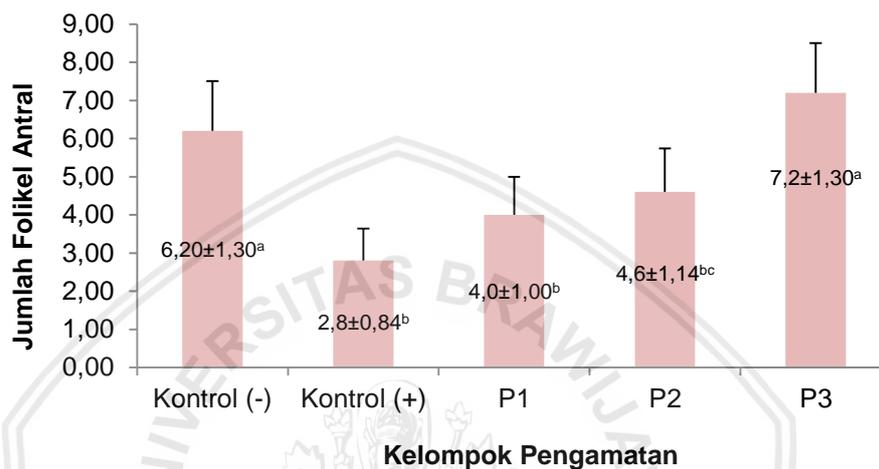
Selain itu juga terdapat perbedaan yang bermakna rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol positif ($2,8 \pm 0,84$) dengan kelompok P2 ($4,6 \pm 1,14$). Jadi, pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB/hari dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus yang diberi DMPA .

Masih dari hasil pada Tabel 5.3 ada perbedaan bermakna pada rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol positif ($2,8 \pm 0,84$) dengan kelompok P3 ($7,2 \pm 1,30$). Tikus hipoestrogen dengan DMPA yang diberi ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari akan meningkatkan jumlah folikel antral bila dibandingkan dengan tikus yang diberi DMPA. Dengan kata lain pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus yang diberi DMPA.

Berdasarkan penjelasan hasil dari Tabel 5.3 di atas, pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg/200 g BB, dan 280 mg/200 g BB pada tikus yang telah diberi DMPA berpengaruh bermakna terhadap peningkatan jumlah folikel antral. Jadi, hipotesis kedua terbukti yaitu pemberian

ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar DMPA.

Rerata jumlah folikel antral pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



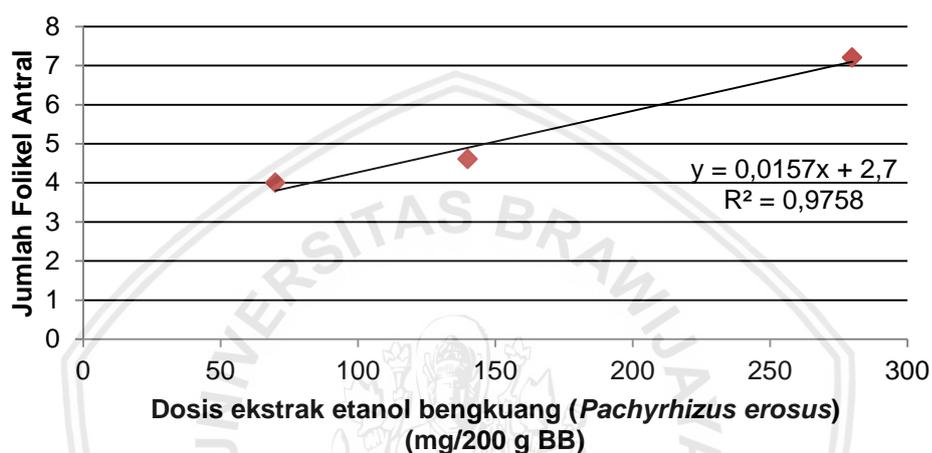
Gambar 5.7 Histogram Rerata Jumlah Folikel Antral

Keterangan: Pada rerata ± SD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} > 0,05$).

Gambar 5.7 di atas memperlihatkan histogram rerata jumlah folikel antral pada tikus yang tidak diberi apapun (kontrol negatif), tikus yang diberi DMPA (kontrol positif), dan 3 kelompok tikus hipoestrogen dengan DMPA dan diberi ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 70 mg/200 g BB (P1), dosis 140 mg/200 g BB (P2), dan dosis 280 mg/200 g BB (P3). Rerata jumlah folikel antral tertinggi pada kelompok P3 dan yang terendah pada batang rerata jumlah folikel antral pada kelompok kontrol positif. Peningkatan jumlah folikel antral seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol bengkuang yang diberikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Jadi, pemberian ekstrak etanol bengkuang ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus yang diberi DMPA. Diantara ketiga dosis ekstrak etanol

bengkuang, dosis 280 mg/200 g BB mampu meningkatkan jumlah folikel antral dengan rerata yang paling tinggi ($7,2 \pm 1,30$).

Pada penelitian ini ingin mengetahui tingkat keeratan pengaruh antara dosis ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap jumlah folikel antral pada tikus yang dipapar DMPA. Adapun model persamaan regresi tersebut ditunjukkan pada Gambar 5.7 di bawah ini.



Gambar 5.8 Model Persamaan Garis Regresi Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Jumlah Folikel Antral

Tampak pada Gambar 5.8 di atas memperlihatkan model persamaan garis regresi yaitu $y = 0,0157x + 2,7$ dengan X adalah dosis ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dan y adalah jumlah folikel antral. Koefisien regresi positif 0,0157 menunjukkan pengaruh yang positif dosis ekstrak etanol bengkuang terhadap jumlah folikel antral. Sedangkan besar prosentase pengaruh adalah $R^2 \times 100\% = 0,9758 \times 100\% = 97,58\%$. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) mampu mempengaruhi peningkatan jumlah folikel antral sebesar 97,58%, sedangkan faktor yang lain di luar penelitian ini mempengaruhi sebesar 2,42%.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap kadar FSH dan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA. Temuan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) secara signifikan dapat meningkatkan kadar FSH dan jumlah folikel antral tikus model hipoestrogen dengan DMPA. Lebih lanjut akan dibahas di bawah ini.

6.1 Pengaruh Paparan DMPA terhadap Kadar FSH pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa paparan DMPA dengan dosis 2,7 mg yang diberikan setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali pada kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan kadar FSH yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN). Jumlah folikel antral pada kelompok kontrol positif (KP) yang dipapar DMPA menurun secara signifikan daripada kelompok kontrol negatif (KN).

Berdasarkan kajian teori, *Depot Medroxyprogesterone Acetate* (DMPA) merupakan metode kontrasepsi suntik hormonal yang mengandung hormon progesteron dengan dosis 150 mg/ml yang disuntikkan secara IM. Mekanisme kerjanya sebagai kontrasepsi adalah mencegah terjadinya fertilisasi. DMPA menghambat pelepasan dan sekresi GnRH dengan kadar FSH dan LH yang rendah sehingga mencegah pematangan folikel dan mencegah terjadinya ovulasi. Selain itu, DMPA menyebabkan penebalan lendir serviks untuk menghalangi sperma masuk ke saluran genital bagian atas, serta merubah lapisan endometrium menjadi atrofi yang berdampak pada perubahan pola

perdarahan dan juga mengurangi kemungkinan terjadinya implantasi (Nelson, 2010; King *et al.*, 2015).

Kandungan progesteron dalam DMPA akan berikatan dan berinteraksi dengan beberapa reseptor, yaitu reseptor progestin, reseptor androgen, reseptor glukokortikoid, dan reseptor mineralokortikoid. Di tingkat seluler, progestin bebas berdifusi menuju sel target, seperti glandula mammae, hipotalamus dan hipofisis kemudian berikatan dengan reseptor progesteron. Setelah berikatan dengan reseptor, progestin akan menghambat pelepasan GnRH dari hipotalamus (Nelson, 2010). Tingginya kadar progesteron akan menstimulasi neuron pada sistem saraf pusat sehingga memicu pengeluaran opioid, dopaminergik, dan gabaergik yang dapat menghambat pelepasan GnRH. Sekresi GnRH yang rendah akan menstimulasi pelepasan FSH dan LH dari hipofisis anterior dalam kadar yang rendah pula. Rendahnya kadar FSH akan menghambat perkembangan dan maturasi folikel sehingga tidak terjadi ovulasi (Fritz & Speroff, 2011; Cornelli, 2013).

Kadar FSH pada pengguna DMPA berada dalam level yang rendah seperti pada saat fase folikuler dini. Kondisi ini dipertahankan sebagai efek kontrasepsi DMPA supaya tidak mendukung dalam perkembangan folikel dan mencegah ovulasi (Fritz & Speroff, 2011; Speroff & Darney, 2010). Siregar *et al.* (2019) melakukan penelitian tentang dampak DMPA pada kadar FSH dengan membandingkan kadar FSH wanita akseptor KB DMPA dan non-akseptor KB. Hasilnya kadar FSH wanita akseptor KB DMPA berada pada level yang sama seperti fase luteal. Artinya kadar FSH pada fase luteal berada dalam level yang rendah karena pada fase ini hormon dominan yang berperan adalah progesteron. Pemberian dosis dan lama paparan DMPA disesuaikan dengan pemberian DMPA pada wanita setiap 3 bulan selama 1 tahun. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa rerata kadar FSH pada kelompok kontrol

positif yang dipapar DMPA lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Berdasarkan pembahasan di atas, maka penelitian ini dapat membuktikan bahwa pengaruh paparan DMPA dapat menurunkan kadar FSH.

6.2 Pengaruh Paparan DMPA terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Paparan DMPA dengan dosis 2,7 mg yang diberikan setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali pada penelitian ini menunjukkan hasil jumlah folikel antral pada kelompok kontrol positif (KP) yang dipapar DMPA menurun secara signifikan daripada kelompok kontrol negatif (KN). Hasil ini sesuai dengan teori bahwa paparan DMPA dalam waktu lama akan menurunkan kadar estrogen dalam tubuh akibat disfungsi ovarium karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium, folikel tidak dapat berkembang dan mengalami atresia karena terjadi apoptosis. Hal ini mengakibatkan tubuh dalam kondisi hipoestrogen. (Haider & Darney, 2007; Borecky *et al.*, 2009). Perkembangan dan maturasi folikel sangat dipengaruhi oleh FSH, dimana FSH bekerja di ovarium dengan menstimulasi folikulogenesis. Pada kondisi normal, selama perkembangan janin mamalia, sel-sel germinal primitif di ovarium memasuki tahap meiosis dan tertahan selama fase profase pada tahap meiosis I. Setiap oosit dikelilingi oleh satu lapisan sel dan memasuki fase istirahat. Ada dua lapisan sel somatik yang berkembang di sekitar oosit. Lapisan terluar terdiri dari sel teka yang terpisah dari lapisan terdalam yang terdiri dari sel granulosa. Kedua jenis sel ini berproliferasi dan memperbesar ukuran folikel sampai rongga tersebut berisi cairan (antrum) (Rimon-Dahari *et al.*, 2016). Sel teka dari perkembangan ovarium menghasilkan androgen yang merespon terhadap LH. Peran FSH menstimulasi sel granulosa untuk menghasilkan enzim aromatase yang berfungsi merubah androgen yang dihasilkan oleh sel teka menjadi estradiol, sehingga terjadi umpan balik negatif pada produksi gonadotropin oleh hipofisis. Dibawah pengaruh FSH, jumlah sel

granulosa meningkat dengan tahapan mitosis. FSH menginduksi proliferasi yang secara khusus dimediasi oleh reseptor FSH pada permukaan sel. Dalam perkembangan folikel, FSH juga meningkatkan produksi estradiol dan jumlah reseptor LH pada sel teka dan granulosa. Selama transisi luteo-folikuler konsentrasi serum FSH meningkat untuk mempertahankan kadarnya pada awal fase folikuler untuk memulai proses perkembangan folikel. Ketika folikel membesar, terbentuk rongga di sekitar oosit sehingga lapisan sel granulosa dan cairan mengelilinginya. Setelah tingkat estradiol sirkulasi yang diproduksi oleh folikel *Graafian* meningkat, estradiol menyebabkan pelepasan LH dan FSH secara tiba-tiba yang kemudian menyebabkan ovulasi. Setelah terjadi ovulasi, peran FSH menurun dan terjadi pembentukan korpus luteum serta pemeliharaan endometrium uterus berada di bawah pengaruh LH (Vegetti & Alagna, 2006; Santi *et al.*, 2018).

Paparan DMPA dapat menyebabkan kondisi hipoestrogen karena sesuai mekanisme kerjanya utamanya dengan mensupresi pelepasan GnRH sehingga kadar FSH dan LH menjadi rendah untuk mencegah pematangan folikel dan mencegah terjadinya ovulasi. Dijelaskan pada penelitian yang dilakukan oleh Miller *et al.* (2000) bahwa pemakaian DMPA selama 6 bulan pada 38 wanita yang menjadi subjek penelitiannya menyebabkan penurunan kadar serum estradiol yang nyata. Lebih dari sepertiga subjek penelitian mengalami hipoestrogenik setelah 6 bulan penggunaan DMPA yang dibuktikan dengan pengukuran kadar estradiol. Penelitian lain dilakukan oleh Siregar *et al.* (2019) yang membandingkan kadar estradiol pada akseptor KB DMPA dengan non-akseptor KB menunjukkan penggunaan DMPA jangka panjang menyebabkan kadar serum estradiol menurun seperti pada saat fase folikuler. Pada penelitian ini injeksi DMPA dilakukan setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dengan dasar relasi usia tikus dan usia manusia. Pemberian dosis DMPA ini sesuai

dengan pemberian DMPA pada wanita setiap 3 bulan selama 1 tahun. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif yang dipapar DMPA rerata jumlah antral lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Berdasarkan pembahasan di atas, maka penelitian ini dapat membuktikan pengaruh paparan DMPA dapat menurunkan jumlah folikel antral.

6.3 Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Kadar FSH pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen dengan DMPA

Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dengan tiga dosis pada kelompok perlakuan dalam penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan pada kadar FSH daripada kelompok kontrol positif (KP). Rerata kadar FSH paling tinggi terdapat pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberi ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 280 mg/200 g BB/hari. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Lukitaningsih (2009) bahwa bengkuang mengandung senyawa isoflavon dengan struktur kimia mirip estrogen. Struktur kimia isoflavon menyerupai 17β -estradiol dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen. Komponen terbesar isoflavon adalah genistein dan daidzein. Berdasarkan hasil analisis dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada umbi bengkuang dihasilkan kadar daidzein 108,831 mg/100 g dan genistein 163,079 mg/100. Isoflavon (daidzein dan genistein) pada bengkuang memiliki struktur mirip dengan 17β -estradiol dan aktivitas seperti estrogen. Sehingga dapat disimpulkan bahwa bengkuang merupakan sumber estrogen alami (Primiani, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Jefferson (2010) membuktikan bahwa konsumsi makanan yang mengandung isoflavon (genistein dan daidzein) dapat mempengaruhi fungsi ovarium. Hal ini dikarenakan fungsi ovarium dikendalikan oleh hormon yang beredar dalam tubuh. Hormon utama yang bertanggung jawab

atas siklus reproduksi wanita adalah estrogen. Estrogen sebagian besar diproduksi di ovarium dan masuk dalam sirkulasi kemudian memberikan sinyal pada otak untuk direspon. Bagian otak yang mengendalikan hormon reproduksi adalah hipotalamus dan hipofisis anterior. Estrogen menstimulasi hipotalamus untuk menghasilkan GnRH yang kemudian memberikan sinyal pada hipofisis anterior untuk menghasilkan FSH dan LH. Hormon tersebut masuk ke dalam sirkulasi dan memberi sinyal pada ovarium untuk ovulasi. Senyawa dengan aktivitas estrogenik berpotensi mempengaruhi persinyalan ini dan menimbulkan respon. Konsumsi makanan yang mengandung senyawa estrogenik (fitoestrogen) dapat berikatan dengan reseptor estrogen α dan β . Hipotalamus dan hipofisis merespon estrogen dengan memproduksi gonadotropin, FSH dan LH yang berperan dalam mengendalikan ovulasi. Sinyal estrogen pada ovarium berperan dalam mengendalikan ekspresi gen yang diperlukan untuk perkembangan folikel dan ekspresi reseptor FSH dan reseptor LH yang merespon sinyal gonadotropin dari hipotalamus dan hipofisis (Jefferson, 2010). Selain itu, fitoestrogen juga berperan dalam mengurangi pembentukan dan aktivitas radikal bebas pada hipotalamus sehingga mencegah penurunan sekresi FSH (Chua *et al.*, 2013).

Fitoestrogen diketahui dapat mempengaruhi keseimbangan hormon dalam tubuh. Apabila mengkonsumsi zat fitoestrogenik dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang lama tentu saja fitoestrogen dapat terakumulasi dalam tubuh. Toksisitas adalah sifat bawaan dari suatu zat. Manifestasi toksisitas dari suatu senyawa tergantung pada dosis dan lamanya paparan senyawa tersebut pada organ. Ginjal merupakan organ ekskresi utama yang berfungsi mengeluarkan sisa metabolisme tubuh sehingga rentan mengalami kerusakan jika terpapar dengan zat yang bersifat toksik (Cotran *et al.*, 2007). Agar

bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat digunakan sebagai sumber fitoestrogen yang efektif dan aman, maka perlu dilakukan analisis toksisitas untuk mengetahui tingkat keamanannya secara pasti. Irmawati dan Primiani (2017) melakukan penelitian tentang analisis toksisitas fitoestrogen dari bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dibandingkan dengan larutan daidzein sintesis pada ginjal tikus dengan pengujian sub kronik atau jangka pendek. Hasilnya, fitoestrogen dari bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) toksisitasnya rendah, sedangkan larutan daidzein sintesis lebih bersifat toksik.

Dalam penelitian ini, pemberian ekstrak etanol bengkuang pada tikus model hipoestrogen dengan DMPA pada kelompok perlakuan menunjukkan hasil rerata kadar FSH yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif (KN). Berdasarkan pembahasan di atas, maka penelitian ini dapat membuktikan hipotesis penelitian bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan kadar FSH pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

6.4 Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Jumlah Folikel Antral pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipoestrogen dengan DMPA

Ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) yang diberikan dalam tiga dosis pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya peningkatan jumlah folikel antral dibandingkan pada kelompok kontrol positif (KP). Rerata jumlah folikel paling banyak terdapat pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberi ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 280 mg/200 g BB/hari. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Primiani (2015) tentang potensi fitoestrogenik dari bengkuang pada struktur jaringan ovarium dan uterus pada tikus premenopause. Pemberian parutan umbi bengkuang berbagai dosis dapat memicu pematangan folikel ovarium dan proliferasi endometrium uterus pada tikus premenopause.

Menurunnya kadar estrogen selama masa premenopause dan pascamenopause menyebabkan banyaknya jumlah reseptor estrogen yang tidak terikat. Hal tersebut juga terjadi pada pengguna KB suntik DMPA yang mengalami hipoestrogen sehingga berdampak negatif pada fungsi ovarium karena berkurangnya jumlah folikel pada ovarium. Penggunaan DMPA jangka panjang dapat menurunkan fungsi reproduksi (Borecky, *et al.*, 2009). Kadar estradiol yang rendah menyebabkan folikulogenesis menjadi terganggu akibatnya folikel tidak dapat berkembang dan menjadi atresia karena terjadi apoptosis. Bila terjadi apoptosis dalam skala besar maka akan terjadi kerusakan jaringan di ovarium sehingga fungsi ovarium menjadi terganggu, folikulogenesis terhambat, tidak terjadi ovulasi sehingga kadar estrogen dalam sirkulasi menjadi rendah (Tasdemir *et al.*, 2009). Rendahnya kadar estrogen endogen pada kondisi hipoestrogen akan menyebabkan tidak terjadinya fase estrus, sehingga pemberian bengkung pada tikus dengan kondisi hipoestrogen dapat menstimulasi fase estrus (Primiani, 2015). Genistein dan daidzein memiliki kemampuan untuk mengikat reseptor estrogen yang disebut *sex hormone binding globulin* (SHGB) yang berfungsi untuk meningkatkan produksi hormon steroid dan bertanggung jawab untuk mengikat estrogen dan mengedarkannya melalui pembuluh darah (Setchell *et al.*, 1998). Penelitian yang dilakukan oleh Sholihah (2016) membuktikan bahwa kandungan fitoestrogen dalam ekstrak etanol bengkung (*Pachyrhizus erosus*) mampu meningkatkan kadar estrogen dalam darah. Hasil penelitian Biben (2012) membuktikan pemberian fitoestrogen dapat meningkatkan kadar estrogen karena adanya ikatan antara fitoestrogen dengan reseptor estrogen β sehingga terjadi umpan balik positif yang menstimulasi hipotalamus untuk menghasilkan GnRH yang kemudian menstimulasi hipofisis anterior untuk meningkatkan kadar FSH untuk memicu folikulogenesis. Maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol

bengkuang dapat memperbaiki kondisi hipoestrogen sehingga dapat meningkatkan fungsi reproduksi.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Primiani (2015) pada tikus premenopause menunjukkan bahwa pemberian bengkuang mampu menstimulasi perkembangan folikel ovarium hingga menjadi folikel tersier. Penurunan proliferasi folikel ovarium selama premenopause menyebabkan terhambatnya pertumbuhan folikel tersier sehingga sekresi hormon estrogen di antrum folikel tersier tidak terjadi (Harrison *et al.*, 1999). Hal ini juga terjadi pada pengguna DMPA yang mekanisme kerjanya menghambat folikulogenesis. Pemberian ekstrak etanol bengkuang dapat mengoptimalkan tingkat estrogen sehingga mampu merangsang folikulogenesis. Hasil dari penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan jumlah folikel antral dibandingkan pada kelompok kontrol positif (KP) dengan rerata jumlah folikel paling banyak terdapat pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberi ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 280 mg/200 g BB/hari. Peningkatan folikulogenesis yang dipicu oleh aktivitas fitoestrogen ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah folikel antral pada gambaran histologi ovarium. Hal ini sejalan dengan penelitian Utama (2002) yang menyatakan bahwa estrogen berfungsi untuk membantu pematangan folikel dan fitoestrogen akan menjadi estrogen aktif serta membantu estrogen melakukan fungsinya sebagai hormon yang membantu pematangan folikel.

Rendahnya kadar estrogen pada kondisi hipoestrogen menyebabkan fase estrus menjadi terganggu, sehingga pemberian ekstrak bengkuang pada tikus model hipoestrogen dapat menstimulasi fase estrus. Kandungan isoflavon (genistein dan daidzein) pada bengkuang sebagai fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen di ovarium dan uterus. Respon yang dihasilkan ketika estrogen dalam kadar yang rendah adalah reseptor estrogen saling berikatan dengan fitoestrogen untuk membantu menyeimbangkan kadar estrogen. Fungsi

estrogen dalam kaitannya dengan reproduksi dapat menyebabkan proliferasi dan pertumbuhan jaringan di organ reproduksi. Penggunaan bahan alami dapat digunakan sebagai alternatif terapi pengganti hormon pada wanita dengan kondisi hipoestrogen, salah satunya untuk mengatasi efek samping yang ditimbulkan akibat pemakaian DMPA. Komponen senyawa yang terkandung dalam bahan alami sangat kompleks dan saling berinteraksi untuk memberikan efek fisiologis (Ioannides, 2002; Zhou *et al.*, 2003).

Berdasarkan beberapa penelitian dan kajian teori di atas, maka penelitian ini dapat membuktikan hipotesis penelitian bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah folikel antral pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

6.5 Keterbatasan Penelitian

1. Belum dilakukan analisis uji kandungan fitoestrogen pada bengkuang varietas lokal dari Kecamatan Kayen Kidul, Kabupaten Kediri, Jawa Timur, sehingga belum dapat dipastikan apakah kandungan fitoestrogennya sama dengan bengkuang varietas lokal dari daerah lain.
2. Pada penelitian ini belum dilakukan analisis kadar estrogen dalam darah untuk memastikan kondisi hipoestrogen setelah pemberian paparan DMPA.

6.6 Implementasi Kebidanan

Penelitian ini menganalisis pengaruh yang ditimbulkan dari pemakaian DMPA dengan dosis dan lama pemberian yang telah disesuaikan dengan penggunaan pada manusia selama 1 tahun. Mekanisme kerja DMPA sebagai kontrasepsi adalah mencegah terjadinya fertilisasi dengan mensupresi pelepasan dan sekresi GnRH dengan kadar FSH dan LH yang rendah sehingga

mencegah pematangan folikel supaya tidak terjadi ovulasi. Selain itu, DMPA menyebabkan penebalan lendir serviks untuk menghalangi sperma masuk ke saluran genital bagian atas, serta merubah lapisan endometrium menjadi atrofi untuk mengurangi kemungkinan terjadinya implantasi.

U.S. Food and Drug Administration (FDA) memberikan peringatan terkait penggunaan DMPA dibatasi untuk jangka waktu 2 tahun. DMPA lebih baik digunakan sebagai kontrasepsi jangka pendek. Banyak faktor yang mempengaruhi pemilihan metode kontrasepsi sehingga sangat memungkinkan bila di Indonesia KB DMPA banyak dipilih dan digunakan selama lebih dari 2 tahun. Tentu saja hal ini akan menimbulkan dampak menurunnya fungsi reproduksi sehingga membutuhkan waktu untuk pemulihan siklus hormonal alami dalam tubuh.

Sebagaimana yang telah diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 28 Tahun 2017 tentang Izin dan Penyelenggaraan Praktik Bidan bahwa bidan memiliki kewenangan dalam memberikan pelayanan kesehatan reproduksi perempuan dan keluarga berencana seperti yang tertera pada pasal 18 huruf c. Maka dari itu, bidan perlu memberikan informasi kepada calon akseptor maupun akseptor KB DMPA tentang efek samping dari kontrasepsi tersebut dan cara untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan dari pemakaian kontrasepsi suntik DMPA, salah satunya dengan memanfaatkan bahan alami seperti bengkuang.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan kadar FSH tikus betina (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.
2. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah folikel antral tikus betina (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA.

7.2 Saran

Dari penelitian ini, saran yang dapat diberikan antara lain:

1. Perlu dilakukan analisis kadar estrogen dalam darah untuk memastikan kondisi hipoestrogen setelah pemberian paparan DMPA.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dengan dosis yang lebih bervariasi untuk menentukan dosis optimal yang berpengaruh terhadap sistem reproduksi pada hewan coba.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh paparan DMPA dan ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) yang diberikan secara bersamaan terhadap sistem reproduksi untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan akibat pemakaian DMPA.

DAFTAR PUSTAKA

- Amitrano, R. and Tortora, G. 2012. *Update: Anatomy & Physiology Laboratory Manual 7th Edition*. Cengage Learning.
- Anupongsanugool, E., Teekachunhatean, S., Rojanasthien, N., Pongsatha, S., dan Sangdee, C. 2005. Pharmacokinetics of Isoflavons, Daidzein and Genistein, After Ingestion of Soy Beverage Compared with Soy Extract Capsules in Postmenopausal Thai Women. *BMC Clin Pharm*. 5(2):2-10.
- Aritonang, T.R., Rahayu, S., Sirait, L.I., Karo, M.B., Simanjuntak, T.P., Natzir, R., Sinrang, A.W., Massi, M.N., Hatta, M. and Kamelia, E., 2017. The Role of FSH, LH, Estradiol and Progesterone Hormone on Estrus Cycle of Female Rats. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 35(1), pp.92-100.
- Aronson, J.K. ed. 2016a. Medroxyprogesterone. *Meyler's side effects of drugs (sixteenth edition): the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, p. 782-786. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-444-53717-1.01026-x.
- Aronson, J.K. ed. 2016b. Phytoestrogens. *Meyler's side effects of drugs (sixteenth edition): the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, p. 755-757. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-444-53717-1.00151-7.
- Bachmann, G., Bouchard C., Hoppe D., Ranganath R., Altomare C., Vieweg A., et al. 2009. Efficacy and safety of lowdose regimens of conjugated estrogens cream administered vaginally. *Menopause* 2009 Jul-Aug;16(4):719-727.
- Badan Kependudukan dan Keluarga Berencana Nasional. 2017. Survei Demografi Kesehatan Indonesia.
- Bahr, J. M. 2018. Ovary, Overview. *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition, Volume 2, p. 3-7. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.64389-1.
- Bakry, Sayed, Zaher O., Merhi, Trudy J., Scalise, Mohamad S. Mahmoud, Ahmed Fadiel, Frederick Naftolin. 2008. Depot-medroxyprogesterone acetate: an update (review article). *Arch Gynecol Obstet* 278:1-12. DOI: 10.1007/s00404-007-0497-z.
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. eds., 2008. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.
- Becker, K.L. ed. 2001. *Principles and practice of endocrinology and metabolism (third edition)*. Lippincott Williams & Wilkins.

- Bedell, S., Nachtigall, M. and Naftolin, F. 2014. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 139, p. 225-236.
- Biben. 2012. Fitoestrogen: Khasiat terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan Keamanan Penggunaannya. Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami, 31 Maret 2012. Bandung.
- Borekci, B., Ingec, M., Kumtepe, Y., Karaca, M., Koc, F., Salman, S., Gulaboglu, M. & Suleyman, H. 2009. Effect of Estrogen, Progesteron, LH, and FSH on Oxidant and antioxidant Parameters in Rat Uterine Tissue. *International journal of Fertility and Sterility*, 3, 119-128.
- Burton, J.L., M. Wells. 2002. The effect of phytoestrogens on the female genital tract (review). *J Clin Pathol* 2002; 55:401-407.
- Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L. and Taft, R.A. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), p.e35538.
- Caligioni, C.S., 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*, 48(1), pp.A-41.
- Campbell, A. N., J. B. Reece, dan L.G. Mitchell. 2004. *Biologi Edisi Kelima Jilid 3*. Jakarta: Erlangga
- Cederroth, C.R., Zimmermann C., Nef S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Mol Cell Endocrinol*; 355:192–200.
- Chua, L.S., Rahaman, N.L.A., Adnan, N.A., Tan, E. and Tjih, T., 2013. Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013.
- Conti, M. & Chang, R. J. 2016. Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. *Endocrinology: Adult and Pediatric*, chapter 125, part 12 Female Reproduction, p. 2179–2191. doi:10.1016/b978-0-323-18907-1.00125-6.
- Cora, M.C., Kooistra, L. and Travlos, G., 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), pp.776-793.
- Cornelli, U. 2013. *Antioxidant Composition for Reducing Oxidatives Stress Ascribable to The Treatment with Hormonal Contraceptive Drugs*. U.S. patent application US13/583,873.
- Cotran R. S., Rennke H., Kumar V. 2007. *Ginjal dan Sistem Penyalurnya. Dalam: Kumar V, Buku Ajar Patologi Robbins Volume 2*. Edisi VII. Jakarta: EGC.
- Cui, D., Daley, W.P., Fratkin, J.D., Haines, D.E., Lynch, J.C., Naftel, J.P. and Yang, G. 2011. *Atlas of histology: with functional and clinical correlations*. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.

- Eroschenko, V.P. and Di Fiore, M.S., 2013. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fritz, M.A. and Speroff, L., 2011. Female infertility. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, 8, pp.1137-90.
- Gal, A., Lin, P.C., Barger, A.M., MacNeill, A.L. and Ko, C., 2014. Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. *Toxicologic pathology*, 42(8), pp.1212-1220.
- Geneser, F. 2007. *Atlas Berwarna Histologi*. Batam: Binarupa Aksara.
- Goldman, J.M., Murr, A.S. and Cooper, R.L. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), pp.84-97.
- Gulinello, M., 2016. Behavioral Core Protocols and Training. *Elevated Plus Maze*. Albert Einstein College of Medicine: Behavioral Core Facility.
- Guyton, A.C. dan J.E. Hall, 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Hafez, E.S.E., Jainudeen, M.R. and Rosnina, Y., 2000. *Hormones, growth factors, and reproduction. Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Haider, S. and Darney, P.D. 2007. Injectable contraception. *Clinical obstetrics and gynecology*, 50(4), p.898-906.
- Hak, A. E., Curhan, G. C., Grodstein, F. & Choi, H. K. 2010. Menopause, postmenopausal hormone use and risk of incident gout. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 1305–1309.
- Hannon, P. R. & Flaws, J. A. 2015. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in Endocrinology*, volume 6, article 8. doi: 10.3389/fendo.2015.00008.
- Hannon, P.R. & Curry, T. E. 2018. Folliculogenesis. *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd edition, Volume 2, p. 72-79. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64628-7.
- Harel, Z., Wolter, K., Gold, M.A., Cromer, B., Stager, M., Johnson, C.C., Brown, R., Bruner, A., Coupey, S., Hertweck, P. and Bone, H. 2010. Biopsychosocial variables associated with substantial bone mineral density loss during the use of depot medroxyprogesterone acetate in adolescents: adolescents who lost 5% or more from baseline vs. those who lost less than 5%. *Contraception*, 82(6), p.503-512.

- Harrison, R.M., Phillippi, P.P., Swan, K.F. and Henson, M.C., 1999. Effect of Genistein on Steroid Hormone Production in the Pregnant Rhesus Monkey (44431). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(1), pp.78-84.
- Hatcher, R.A. 2004. Depo-Provera Injections, Implants, and Progestin-Only Pills (Minipills). In Hatcher R.A., Trussell J., Stewart F.H., Nelson A.L., Cates Jr. W., Guest F., Kowal D. *Contraceptive Technology* (18th rev. ed.). New York: Ardent Media. p. 461–494.
- Heykants, M. and Mahabir, E., 2016. Estrous cycle staging before mating led to increased efficiency in the production of pseudopregnant recipients without negatively affecting embryo transfer in mice. *Theriogenology*, 85(5), pp.813-821.
- Hubscher, C.H., Brooks, D.L. and Johnson, J.R., 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry*, 80(2), pp.79-87.
- Ioannides, C., 2002. Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica*, 32(6), pp.451-478.
- Irmawati, F. dan Primiani, C.N., 2017. Perbandingan Uji Toksisitas Fitoestrogen Pada Ginjal Tikus (Sprague Dawley) Yang Diinduksi Daidzein Dan Air Perasan Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*). Bioeksperimen: *Jurnal Penelitian Biologi*, 3(2), pp.52-60.
- Jefferson, W.N., 2010. Adult ovarian function can be affected by high levels of soy. *The Journal of nutrition*, 140(12), pp.2322S-2325S.
- Karuniawan, A. 2004. *Cultivation status and genetic diversity of yam bean (Pachyrhizus erosus (L.) Urban) in Indonesia*. (Doctoral dissertation, Msc. Dissertation Universitaet of Goettingen, Cuvillier Verlag Goettingen, Germany. Retrived from <https://goo.gl/nBJhBy>, on January 4.
- KeMenKes, R.I., 2016. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2016*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- King, T.L., Brucker, M.C., Fahey, J., Kriebs, J.M. and Gegor, C.L. eds., 2015. *Varney's midwifery (fifth edition)*. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning.
- Koebele, S.V. and Bimonte-Nelson, H.A., 2016. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, 87, pp.5-17.
- Kuo, C.-F., Grainge, M. J., Zhang, W., & Doherty, M. 2015. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(11), 649–662. doi:10.1038/nrrheum.2015.91.

- Lim, T. K. 2016. *Pachyrhizus erosus*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*, p. 465-481. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-7276-1_20.
- Linda, J. and Heffner, S.D. 2008. *At a Glance Sistem Reproduksi*. Edisi kedua. Erlangga, pp.25-37.
- Lukitaningsih, E. 2009. *The Exploration of Whitening and Sun Screening Compounds in Benguang Roots (Pachyrhizus erosus)*. Dissertation, Wurzburg: Bayerischen Julius Maximillians University.
- Marcondes, F.K., Bianchi, F.J. and Tanno, A.P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of Biology*, 62(4A), p.609-614.
- Messinis, I.E., Messini, C.I., Dafopoulos, K. 2014. Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reproductive Biomedicine Online*, 28; 714–722.
- Michel, T., Halabalaki, M. and Skaltsounis, A.L. 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. *Planta medica*, 79(07), p.514-532.
- Miller, L., Patton, D.L., Meier, A., Thwin, S.S., Hooton, T.M. and Eschenbach, D.A., 2000. Depomedroxyprogesterone-induced hypoestrogenism and changes in vaginal flora and epithelium. *Obstetrics & Gynecology*, 96(3), pp.431-439.
- Molnar, C. and Gair, J. 2013. *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*. BC Campus.
- Mostrom, M. & Evans, T. J. 2018. Phytoestrogens. Reproductive toxicity and endocrine disruption. In *Veterinary Toxicology (Third Edition)*, p. 817–833. doi:10.1016/b978-0-12-811410-0.00060-x.
- National Research Council, 2010. *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Nelson, A.L., 2010. DMPA: battered and bruised but still needed and used in the USA. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 5(6), pp.673-686.
- Nurjanah, N. & Ihsan, N., 2013. *Ancaman Dibalik Segarnya Buah dan Sayur*. Jakarta: Pustaka Bunda.
- Paccola, C.C., Resende, C.G., Stumpp, T., Miraglia, S.M. and Cipriano, I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod*, 10(4), pp.677-683.

- Parhizkar, S. et al., 2011. In vivo estrogenic activity of *Nigella sativa* different extracts using vaginal cornification assay. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), hal.6939–6945.
- Reiter, S. 2013. Barriers to effective treatment of vaginal atrophy with local estrogen therapy. *Int J Gen Med* 2013;6:153-158.
- Poluzzi, E., Piccinni, C., Raschi, E., Rampa, A., Recanatini, M. and De Ponti, F. 2014. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *Current medicinal chemistry*, 21(4), pp.417-436.
- Primiani, C.N. 2013. Dinamika Senyawa Daidzein Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus Erosus*) dalam Darah Serta Potensinya pada Tikus Putih Betina. In *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning* (Vol. 10, No. 1).
- _____. 2015. The Phytoestrogenic Potential of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) on Ovarian and Uterine Tissue Structure of Premenopausal Mice. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 4(1), pp.5-9.
- Primiani, C.N., Lestari, U., Amin, M. and Sumitro, S.B. 2013. Comparative Study of Effects Daidzein Contained in Yam Tuber (*Pachyrhizus Erosus*) and Pure Daidzein: The Dynamics of Chemical Compounds and Potential in Myometrium. *Journal of Biological Researches*, 18, pp.122-125.
- Qin, Y., Shu, F., Zeng, Y., Meng, X., Wang, B., Diao, L., Wang, L., Wan, J., Zhu, J., Wang, J. and Mi, M., 2013. Daidzein Supplementation Decreases Serum Triglyceride and Uric Acid Concentrations in Hypercholesterolemic Adults with the Effect on Triglycerides Being Greater in Those with the GA Compared with the GG Genotype of ESR- β Rsa I–3. *The Journal of nutrition*, 144(1), pp.49-54.
- Quinn, R, 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?. *Nutrition*, 21(6), p.775.
- Ratnasabapathy, R., Dhillon, W.S. 2013. The effects of kisspeptin in human reproductive function-Therapeutic implications. *Current Drug Targets*, 14; 365–371.
- Reiter, S. 2013. Barriers to effective treatment of vaginal atrophy with local estrogen therapy. *Int J Gen Med* 2013;6:153-158.
- Retana-Marquez, S., Munoz-Gutierrez, M., Duarte, G., Vielma, J., Fitz-Rodriguez, G. and Keller, M., 2012. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15; S129 – SS145.

- Rietjens, I.M., Sotoca, A.M., Vervoort, J. and Louisse, J. 2013. Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), p. 100-113.
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L. and Dekel, N. 2016. Ovarian folliculogenesis. In *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development* (p. 167-190). Springer, Cham.
- Sadler, T.W. 2011. *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Santi, D., Casarini, L., Marshall, G. R., & Simoni, M. 2018. FSH (Follicle-Stimulating Hormone). *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, Second Edition, Volume 2. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64300-3.
- Santoso, Singgih. 2005. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. Jakarta: Elex Media Komputindo (Gramedia).
- Sengupta, P. 2011. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age. *Biomed Int*, 2(2), pp.81-89.
- _____. 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6), p.624.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. and Heubi, J.E. 1998. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), pp.1453S-1461S.
- Sholihah, Riyadlotus. Efek Pemberian Ekstrak Etanol Bengkoang (*Pachyrhizus Erosus*) Terhadap Gambaran Histopatologi Kaput Tulang Tibia Dan Kadar Estrogen Darah Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Menopause. [thesis]. Malang: Universitas Brawijaya, 2016.
- Sierra-Ramírez, José Alfredo, Roger Lara-Ricalde, Miguel Lujan, Norma Velázquez-Ramírez, Marycarmen Godínez-Victoria, Ivonne Araceli Hernández-Munguía, Agustin Padilla, and Josué Garza-Flores. "Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics after subcutaneous and intramuscular administration of medroxyprogesterone acetate (25 mg) and estradiol cypionate (5 mg)." *Contraception* 84, no. 6 (2011): 565-570.
- Simoni, M., Casarini, L. 2014. Mechanisms in endocrinology: Genetics of FSH action: A 2014-and-beyond view. *European Journal of Endocrinology*, 170; 91–107.

- Siregar, Nurelilasari, Rauza Sukma Rita, Yusrawati. 2019. The Effect of Depot Medroxyprogesterone Acetate Administration on the Levels of Follicle-Stimulating Hormone, Progesterone, Estradiol, and Calcium. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 12, Issue 1, 2019, 293-296.
- Sirotkin, A.V. and Harrath, A.H. 2014. Phytoestrogens and their effects. *European journal of pharmacology*, 741, p. 230-236. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.057.
- Speroff, L. and Darney, P.D. 2010. *Injectable Contraception. A Clinical Guide for Contraception* 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 201–220. ISBN 0-7817-6488-2.
- Spevack, E., 2013. The long-term health implications of depo-provera. *Integrative Medicine*, Vol. 12, No. 1. p. 27-34.
- Steel, Robert G.D. dan Torrie, James H. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika suatu pendekatan biometrik*. (Terjemahan Bambang Sumantri). Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Strauss, J.F. and Barbieri, R.L., 2013. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology E-Book: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. Elsevier Health Sciences.
- Sudjadi, 1986. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Supranto, J., 2000. *Teknik sampling untuk survei dan eksperimen*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Tasdemir, N., Kilic, S., Lortlar, N., Yuksel, B., and Ozaksit, G. 2009. The Long-term Apoptotic Effect of Progesterone-only Contraceptive on Endometrium and Ovary in Rats. *American Society for Reproductive Medicine*. Volume 92, Issue 3, Supplement, Page S91. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.07.1022.
- Townson, D. H., & Combelles, C. M. H. 2012. Ovarian follicular atresia. *In Basic Gynecologyd Some Related Issues* (p. 43–76). Rijeka, Croatia: InTech.
- Tunikasari, A.S., 2015. *Pengaruh Ekstrak Bengkuang (Pachyrhizus erosus) terhadap Kadar Kolesterol Total Darah Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diberi Diet Tinggi Lemak* (Doctoral dissertation, Universitas Sebelas Maret).
- United States Department Of Agriculture , 2018. Yambean (Jicama). Available from:<https://Ndb.Nal.USda.Gov/Ndb/Foods/Show?Ndbno=11603&Fg=&Man=&Lfacet=&Format=Abridged&Count=&Max=25&Offset=4975&Sort=F&Qlo okup=&Rptfrm=NI&Nutrient1=509&Nutrient2=&Nutrient3=&Subset=0&Totc ount=5009&Measureby=M>
- Vegetti, W. and Alagna, F. 2006. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online*, 12(6), p.684-694.

- Villegas, R., Xiang Y.B., Elasy T., et al. 2012. Purine-rich foods, protein intake, and the prevalence of hyperuricemia: The Shanghai Men's Health Study. *Journal of Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 22(5):409-416. doi:10.1016/j.numecd.2010.07.012.
- Wiknjosastro, G.H., 2009. Fisiologi Janin. Dalam: Abdul Bari Saifuddin, Trijatmo Rachimhadhi, Gulardi Wiknjosastro, penyunting. Ilmu Kebidanan Sarwono Prawiroharjo, Jakarta: PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, h, pp.157-159.
- Williams, C. J. & Erickson, G. F. Morphology and Physiology of the Ovary. Endotext [internet] - NCBI Bookshelf. 2012 [cited January 30, 2012.]. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/?report=printable>.
- World Health Organization. 2007. *Hormonal Contraception and Bone Health: Provider Brief*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Departement of Reproductive Health and Research.
- Zainuddin, M. 2011. *Metodologi Penelitian*. Surabaya: Unair Press.
- Zhou, S., Gao, Y., Jiang, W., Huang, M., Xu, A. and Paxton, J.W., 2003. Interactions of herbs with cytochrome P450. *Drug metabolism reviews*, 35(1), pp.35-98.

