

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL
BENGKUANG (*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP
JUMLAH SEL STROMA DAN EKSPRESI RESEPTOR
PROGESTERON PADA ENDOMETRIUM TIKUS
WISTAR YANG DIINJEKSI DMPA**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
EKA FRENTY HADININGSIH
176070400111025**

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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL
BENGGUANG (*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP
JUMLAH SEL STROMA DAN EKSPRESI RESEPTOR
PROGESTERON PADA ENDOMETRIUM TIKUS
WISTAR YANG DIINJEKSI DMPA

Oleh:
EKA FRENTY HADININGSIH
176070400111025

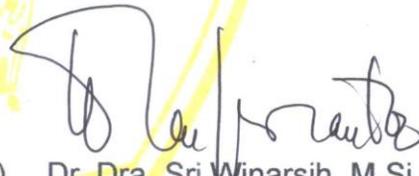
Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal : 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING



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

Ketua



Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt
NIP 195408231981032001

Anggota

29 JUL 2019

Malang,
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



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

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL
BENGKUANG (*Pachyrhizus erosus*) TERHADAP
JUMLAH SEL STROMA DAN EKSPRESI RESEPTOR
PROGESTERON PADA ENDOMETRIUM TIKUS
WISTAR YANG DIINJEKSI DMPA

Oleh:
EKA FRENTY HADININGSIH
176070400111025

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

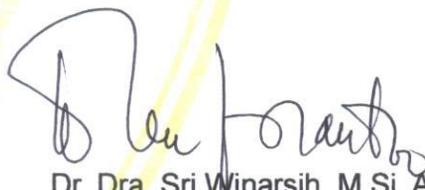
KOMISI PENGUJI



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

NIP 195011101980021001

Ketua



Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt

NIP 195408231981032001

Anggota Penguji



Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes

NIP 196603231997032001

Anggota Penguji



Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K)

NIP 196902041999031008

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 : Eka Frenty Hadiningsih
NIM : 176070400111025
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

HALAMAN PERUNTUKAN

*Terima kasih kepada Allah SWT
Atas ridho dan rahmat-Nya...
Terima kasih untuk Bapak dan Ibu
Atas restu dan dukungannya selalu...
Terima kasih untuk suami
Atas restu, dukungan dan cinta kasihmu...
Terima kasih untuk putri kecilku Deanisa Sofia Andika
Atas perjuangan Bersama bunda selama setahun penelitian ini...
Terima kasih untuk diriku yang telah berusaha dan tak henti berdoa
Atas perjuanganmu Bersama teman-temanmu...
Dan terima kasih untuk sahabat seperjuangan penelitianku sukses kita bersama adalah berkat dan
anugrah dari-Nya...*



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyajikan penulisan tesis yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Jumlah Sel Stroma dan Ekspresi Reseptor Progesteron pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA”.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok pokok yang meliputi: DMPA, ekstrak bengkuang, sel stroma endometrium, reseptor progesteron, tikus wistar. 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 Program Studi Magister Kebidanan 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 Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Prof. Dr. dr. Noorhamdani, AS, DMM, SpMK(K) selaku Ketua Komisi Pembimbing dan Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSI selaku Anggota Pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukannya selama proses penyusunan tesis ini.

5. Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes selaku Penguji I dan Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K). Selaku Penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
6. Ketua Yayasan Stikes Wiyata Husada beserta segenap jajarannya yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Dr. Dra. Ettie Rukmigarsari, M.Kes., selaku konsultan penelitian dan analisis data statistik atas bantuannya dalam penelitian hingga selesai.
8. Kedua orang tua, suami dan keluarga yang telah memberikan dukungan dan perhatian selama menyelesaikan pendidikan dan penelitian.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Juli, 2019

Penulis

RINGKASAN

Eka Frenty Hadiningsih

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Jumlah Sel Stroma dan Ekspresi Reseptor Progesteron pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas.

Ketua Komisi Pembimbing : Prof. Dr. dr. Noorhaamdani AS, DMM, SpMK(K) ; Anggota : Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt.

DMPA merupakan kontrasepsi hormonal dengan kandungan progesteron yang bekerja dengan cara menghambat pelepasan GnRH sehingga akan menyebabkan penurunan terhadap FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang berperan terhadap pematang folikel di ovarium untuk memproduksi dan melepaskan hormon estrogen. Terhambatnya perkembangan folikel selama fase preovulatory menyebabkan estrogen endogen yang dihasilkan menjadi lebih rendah atau hipoestrogen. DMPA memberikan efek samping setelah penggunaan jangka panjang yaitu kembalinya kesuburan yang membutuhkan waktu cukup lama yaitu 6 sampai 8 bulan dan lebih pada beberapa wanita. Hal tersebut dipengaruhi oleh kondisi hipoestrogen yang menyebabkan sel-sel pada endometrium mengalami perubahan dan endometrium menjadi atrofi. Rendahnya estradiol pada penggunaan DMPA juga mempengaruhi sekresi dari reseptor steroid termasuk reseptor progesteron. Untuk mengurangi efek jangka panjang dari penggunaan DMPA dapat memanfaatkan bahan alami seperti bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) yang mengandung senyawa isoflavon dengan struktur kimia dan fungsional menyerupai 17β -estradiol. Tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

Penelitian dilakukan secara *true experimental-post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur Wistar sebagai hewan coba yang dibagi menjadi 5 kelompok pengamatan yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif (KN) tanpa diberi DMPA dan ekstrak bengkuang dan 4 kelompok perlakuan yang diberi injeksi DMPA sebanyak 2,7 mg setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali. Setelah pemberian paparan DMPA dilanjutkan dengan pemeriksaan apusan vagina untuk menentukan kondisi hipoestrogen, kemudian 3 kelompok perlakuan diberikan ekstrak bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dengan dosis 70 mg/200 g BB/hari (P1), 140 mg/200 g BB/hari (P2), dan 280 mg/200 g BB/hari (P3). Setelah pemberian ekstrak etanol bengkuang dilakukan pembedahan pada fase proestrus dan dilanjutkan dengan pemeriksaan histopatologi jumlah sel stroma endometrium dengan pewarnaan *Hematoksillin Eosin* (HE) dan pengamatan imunohistokimia terhadap ekspresi reseptor progesteron.

Penelitian menghasikan penurunan jumlah sel stroma dan penurunan ekspresi reseptor progesteron pada kelompok kontrol positif yaitu tikus yang diinjeksi DMPA dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang tidak diberikan injeksi DMPA. Penurunan terhadap jumlah stroma disebabkan oleh rendahnya estrogen dalam tubuh karena pengaruh paparan DMPA yang lama. Paparan DMPA jangka panjang dapat mempengaruhi perubahan molekuler dan struktural pembuluh darah serta sel-sel endometrium. kondisi hipoestrogen juga menurunkan ekspresi reseptor steroid progesteron dan estrogen karena normalnya kadar estradiol yang tinggi pada fase proliferasi akan meningkatkan ekspresi dari reseptor progesteron dan estrogen sebaliknya kadar progesteron yang tinggi akan menghambat ekspresi dari reseptor progesteron dan estrogen. Sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron dibandingkan kelompok kontrol positif. ekstrak etanol bengkuang mengandung fitoestrogen yang memiliki struktur senyawa dan fungsi yang mirip dengan 17β -estradiol. Fitoestrogen termasuk dalam kelompok isoflavon yang merupakan senyawa turunan dari tumbuhan yang memiliki afinitas mengikat yang signifikan terhadap reseptor estrogen baik $ER\alpha$ maupun $ER\beta$ meskipun lebih lemah daripada estradiol. Ekstrak bengkuang juga

dapat meningkatkan proliferasi sel endometrium sehingga meningkatkan ketebalan endometrium. Fitoestrogen dalam bengkuang telah diteliti dapat digunakan sebagai HRT pada tikus yang diovariectomi. Sehingga pemberian ekstrak bengkuang dapat meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

SUMMARY

Eka Frenty Hadiningsih

Effect of Bengkuang Ethanol Extract (*Pachyrhizus erosus*) on Stroma Cell Number and Expression of Progesterone Receptors on Wistar Rat Endometrium injected by DMPA, Midwifery Master's Degree Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Chair of Supervisory Commission : Prof. Dr. dr. Noorhaamdani AS., DMM, SpMK(K); Member : Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Sc., Apt.

DMPA is a hormonal contraception containing progesterone which works by inhibiting the release of GnRH so that it will cause a decrease in FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) which plays a role in the embedding of follicles in the ovary to produce and release the hormone estrogen. The inhibition of follicle development during the preovulatory phase results in lower endogenous estrogen or hypoestrogens. DMPA has side effects after long-term use, namely the return of fertility, which takes quite a long time, which is 6 to 8 months and more in some women. This is affected by the condition of hypoestrogens that cause cells in the endometrium to change and the endometrium becomes atrophic. The low estradiol in the use of DMPA also affects the secretion of steroid receptors including progesterone receptors. To reduce the long-term effects of using DMPA, it can utilize natural ingredients such as jicama (*Pachyrhizus erosus*) which contain isoflavone compounds with chemical and functional structures resembling 17β -estradiol. The purpose of this study was to determine the effect of bengkuang ethanol extract (*Pachyrhizus erosus*) on the number of stromal cells and the expression of progesterone receptors in wistar rat endometrium injected with DMPA.

The study was carried out by true experimental post-test only control group design. This study used 25 Wistar strains (*Rattus norvegicus*) female as experimental animals divided into 5 observation groups consisting of one negative control group (KN) without DMPA and yam extract and 4 treatment groups given 2.7 DMPA injection mg every 3 days and repeated 4 times. After administration of DMPA exposure followed by examination of vaginal smear to determine the condition of hypoestrogens, then 3 treatment groups were given bengkuang extract (*Pachyrhizus erosus*) at a dose of 70 mg / 200 g BW / day (P1), 140 mg / 200 g BW / day (P2) and 280 mg / 200 g BB / day (P3). After administration of bengkuang ethanol extract, surgery was performed at the proestrus phase and continued with histopathological examination of the number of endometrial stromal cells by staining Hematoksillin Eosin (HE) and immunohistochemical observations on the expression of progesterone receptors.

The study resulted in a decrease in the number of stromal cells and a decrease in the expression of progesterone receptors in the positive control group ie DMPA-injected mice compared to the negative control group not given DMPA injection. The decrease in the number of stroma is caused by low estrogen in the body due to the influence of prolonged DMPA exposure. Long-term exposure to DMPA can affect changes in molecular and structural blood vessels and endometrial cells. Hypoestrogen conditions also reduce the expression of steroid progesterone and estrogen receptors because normally high estradiol levels in the proliferative phase will increase the expression of progesterone and estrogen receptors whereas high progesterone levels will inhibit the expression of progesterone and estrogen receptors. Whereas in the treatment groups P1, P2, and P3 showed an increase in the number of stromal cells and expression of progesterone receptors compared to the positive control group. Bengkuang ethanol extract contains phytoestrogens which have a compound structure and functions similar to 17β -estradiol. Phytoestrogens are included in the isoflavone group, which is a derivative of plants that has a significant binding affinity for estrogen receptors both ER α and ER β even though they are weaker than estradiol. Bengkuang extract can also increase endometrial cell proliferation to increase endometrial thickness. Phytoestrogens in Bengkuang have been studied as HRT in ovariectomized rats. So that the administration of yam extract can increase the number of stromal cells and the expression of progesterone receptors in wistar mice injected with DMPA.

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN	viii
<i>SUMMARY</i>	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. DMPA (<i>Depot Medroxyprogesterin Acetat</i>).....	8
2.2. Uterus.....	14
2.3. Reseptor Progesteron.....	22
2.4. Pengaruh DMPA pada Endometrium dan <i>Progesterone Receptor</i>	26
2.5. Ekstrak Bengkuang (<i>Pachyrizus erosus</i>)	30
2.6. Efek Fitoestrogen Ekstrak Bengkuang terhadap DMPA	31
2.7. <i>Rattus norvegicus</i>	33
BAB 3 KERANGKA TEORI, KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	39
3.1. Kerangka Teori	39
3.2. Kerangka Konsep	41
3.3. Hipotesis Penelitian	43
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	44

4.1. Jenis dan Desain Penelitian.....	44
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	45
4.3. Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.4. Bahan dan Alat	46
4.5. Variable Penelitian	48
4.6. Definisi Operasional	49
4.7. Prosedur Penelitian	50
4.8. Alur Penelitian	60
4.9. Analisa Data	61
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	62
5.1. Hasil Pengamatan Laboratorium	62
5.2. Hasil Analisis Data.....	69
BAB 6 PEMBAHASAN.....	76
6.1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang Terhadap Jumlah Sel Stroma Endometrium pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA	79
6.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang Terhadap Ekspresi Reseptor Progesteron pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA	81
6.3. Keterbatasan Penelitian.....	86
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	88
7.1. Kesimpulan.....	88
7.2. Saran.....	88
DAFTAR PUSTAKA	90
LAMPIRAN	99
RIWAYAT HIDUP	111

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Manfaat Kesehatan Nonkontrasepsi dari <i>Depot Medroxyprogesterone Acetate</i> (DMPA)	12
Tabel 2.2	Fisiologi Umum dan Data Reproduksi pada <i>Rattus norvegicus</i> ..	38
Tabel 4.1	Definisi Operasional Penelitian	49
Table 5.1	Hasil Uji Normalitas Data	69
Tabel 5.2	Hasil Uji <i>Duncan</i> pada Jumlah Sel Stroma dan Ekspresi Reseptor Progesteron.....	70
Tabel 5.3	Hasil Uji Korelasi.....	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus Bangun Progesteron dan Progestin pada DMPA	9
Gambar 2.2	Regulasi Hipotalamus, Pituitari dan Ovarium pada Siklus Menstruasi.....	16
Gambar 2.3	Perubahan Lapisan Endometrium Sepanjang Siklus Menstruasi.....	20
Gambar 2.4	Aktivasi Reseptor Progesteron oleh Ligan Hormon Progesteron.....	24
Gambar 2.5	Morfologi Sel Stroma dan Pembuluh Darah Endometrium Terhadap Pemberian Progestin	28
Gambar 2.6	Bengkuang (<i>Pachyrizus erosus</i>).....	31
Gambar 2.7	Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Wistar.....	33
Gambar 2.8	Siklus Estrus pada Hewan Coba Tikus	35
Gambar 2.9	Penilaian Sitologi Vagina pada Siklus Estrus Tikus	36
Gambar 2.10	<i>Vaginal Smear</i> pada Tikus dengan Ovariektomi	37
Gambar 3.1	Kerangka Teori	39
Gambar 3.2	Kerangka Konsep.....	41
Gambar 4.1	Rancangan Penelitian	44
Gambar 4.2	Alur Penelitian	60
Gambar 5.1	Hasil Pemeriksaan Apusan Vagina pada Tikus	64
Gambar 5.2	Pengamatan sel stroma endometrium pada tikus dengan pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE) pada irisan endometrium menggunakan <i>microscope dot slide Olympus SC10</i> dengan pembesaran 400 kali.....	66
Gambar 5.3	Pengamatan immunohistokimia ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus menggunakan <i>microscope dot slide Olympus SC10</i> dengan pembesaran 400 kali.....	68
Gambar 5.4	Histogram Rerata Jumlah Sel Stroma Endometrium.....	72
Gambar 5.5	Histogram Rerata Ekspresi Reseptor Progesteron Endometrium	73

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	99
Lampiran 2	Surat Keterangan Ekstrak Bengkuang.....	100
Lampiran 3	Surat Keterangan Pembelian Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	101
Lampiran 4	Surat Keterangan LOA	102
Lampiran 5	Hasil SPSS Uji Normalitas Data	103
Lampiran 6	Hasil SPSS Uji <i>One Way Anova</i> dan Uji <i>Duncan</i>	104
Lampiran 7	Hasil SPSS Uji Korelasi <i>Spearman</i>	106
Lampiran 8	Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (<i>Pachyrhizus erosus</i>)	107
Lampiran 9	Foto Dokumentasi Penelitian	108
Lampiran 10	Surat Bebas Plagiasi	110

DAFTAR SINGKATAN

ADAMTS-1	: <i>A Disintegrin and Metalloprotease with Tromboxan Motif 1</i>
AF-1, -2, -3	: <i>Activated Factor 1,2,3</i>
AKDR	: <i>Alat Kontrasepsi Dalam Rahim</i>
Bax	: <i>Bcl-2 associated x protein</i>
Bcl-2	: <i>B Cell Lymphoma 2</i>
BMD	: <i>Bone Mineral Density</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
cGKII	: <i>cyclic GMP-dependent protein kinase II</i>
DMPA	: <i>Depot-medroxyprogesterone Acetate</i>
DVT	: <i>Deep Vein Trombosis</i>
EPE	: <i>Ekstrak Etil Pachyrizus erosus</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
ER α dan ER β	: <i>Estrogen Receptor α dan Estrogen Receptor β</i>
ET-2	: <i>Endothelin-2</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
HDL	: <i>High Dendity Lipoprotein</i>
HPO	: <i>Hipotalamus, Pituitari, Ovarium</i>
HRT	: <i>Hormone Replacement Therapy</i>
IHC	: <i>Immunohistochemistry</i>
IM	: <i>Intra Muscular</i>
IUD	: <i>Intra Uterine Device</i>
KB	: <i>Keluarga Berencana</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>

LFT	: <i>Liver Function Test</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LNG	: <i>Levonogestrel</i>
LNG-IUS	: <i>Levonogestrol-Intra Uterine System</i>
MAL	: <i>Metode Amenirea Laktasi</i>
MKJP	: <i>Metode Kontrasepsi Jangka Panjang</i>
MOP	: <i>Metode Operatif Pria</i>
MOW	: <i>Metode Operatif Wanita</i>
Net-En	: <i>Norethindrone Enanthate</i>
OVX	: <i>Ovariektomi</i>
P450	: <i>Protein 450</i>
PPAR γ	: <i>Proliferator-activated Receptor γ</i>
PR	: <i>Progesterone Receptor</i>
PRA	: <i>Progesterone Receptor A</i>
PRB	: <i>Progesterone Receptor B</i>
Snap25	: <i>Synaptosome-associated protein 25</i>
TC	: <i>Total Cholestrol</i>
TGL	: <i>Trigleserida</i>
USG	: <i>Ultrasonografi</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Estrogen merupakan hormon seks steroid yang berperan penting dalam mekanisme sistem reproduksi termasuk fertilitas pada mamalia (Findlay *et al.*, 2010). Rendahnya kadar estrogen dalam tubuh merupakan kondisi defisiensi estrogen atau hipoestrogen yang dapat dialami oleh wanita dengan berbagai penyebab. Menopause diketahui sebagai salah satu pemicu rendahnya kadar estrogen pada wanita. Namun, beberapa penelitian terhadap penggunaan kontrasepsi memberikan hasil bahwa penggunaan kontrasepsi hormonal terutama yang mengandung progesteron dalam jangka panjang mengakibatkan penggunaannya memiliki kadar estradiol yang relatif rendah dan beberapa mengalami gejala defisiensi estrogen (Lee, 2017).

Kontrasepsi hormonal progestin yang secara luas digunakan dan diterima diseluruh dunia adalah kontrasepsi suntik *Depot Medroxy Progsterone Acetat* (DMPA). Menurut Biro Referensi Populasi 2013 di Indonesia penggunaan DMPA adalah 31,9%, di Bhutan 28,9%, di Sri Lanka 14,8%, di Thailand 14%, di Bangladesh 11,2% dan di Nepal 9,2%. Jika dibandingkan antara kontrasepsi kombinasi hormonal yaitu *Net-En* dan *Cyclofem*, kontrasepsi DMPA dengan hanya mengandung progestin memberikan berbagai kelebihan yang menguntungkan terutama memiliki efektivitas tinggi dan dapat digunakan oleh wanita pada masa laktasi dan tidak dianjurkan menggunakan kontrasepsi dengan kandungan estrogen didalamnya (Jacobstein & Polis, 2014).

Efektivitas dari DMPA berhubungan dengan mekanisme kerjanya yang mempengaruhi aktivitas hormon steroid pada ovarium. Mekanisme kerja utama DMPA adalah dengan mencegah kehamilan terutama melalui penekanan ovulasi

dan penghambatan perkembangan folikel pada ovarium. Frekuensi *Gonadotropin-Releasing Hormone* (GnRH) yang dilepaskan oleh hipotalamus diturunkan, dan menyebabkan penurunan terhadap pelepasan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) oleh hipofisis anterior. Selain itu, pengaruh dari suntikan progestin juga akan mengakibatkan penebalan lendir serviks sehingga sperma terlalu sulit untuk penetrasi mencapai uterus dan menyebabkan dinding endometrium atrofi (Norwitz & Schorge, 2007; El Fattah, 2014)

Efek samping terhadap penggunaan DMPA yang paling banyak terjadi adalah kembalinya kesuburan setelah pemberhentian DMPA yang membutuhkan waktu cukup lama lebih dari 6 sampai 8 bulan. Menurut Haider & Darney (2007) hal ini berkaitan dengan masa aktif DMPA yang membutuhkan waktu 6 hingga 8 bulan untuk menghilang dalam tubuh dan lebih lama pada beberapa wanita. DMPA memberikan efek terhadap kadar estrogen yang dihasilkan ovarium menjadi rendah. Hal ini dipengaruhi oleh penghambatan perkembangan folikel yang menghasilkan estrogen pada fase preovulasi. Kondisi hipoestrogen ini pada sistem reproduksi dapat mengakibatkan terganggunya fungsi ovarium dan endometrium (Speroff & Darney, 2010).

Penggunaan DMPA lebih dari 6 bulan menyebabkan atrofi pada lapisan endometrium yang terdiri dari sel epitel, dan sel stroma, juga terjadinya penurunan kepadatan pembuluh darah endometrium yang terdiri dari pembuluh darah mikro yang ber dinding tipis. Perubahan terhadap pembuluh darah endometrium berhubungan dengan gangguan perdarahan pada wanita serta adanya reaksi peradangan yang ditandai dengan peningkatan jumlah leukosit pada endometrium (Dinh *et al.*, 2015). Pemeriksaan histologi pada endometrium menunjukkan efek dari progestogen yang bervariasi, seperti atrofi penekanan proliferasi, serta berkurangnya jumlah dan diameter dari kelenjar. Perubahan molekuler dan struktural pada pembuluh darah, serta sel-sel endometrium dipengaruhi oleh

adanya perubahan inflamasi yang terjadi pada wanita yang menggunakan DMPA jangka panjang (Hickey dan Salamonsen, 2008).

Penggunaan hormon progesteron pada DMPA juga mempengaruhi aktivitas dari reseptor progesterone. *Progesteron Receptor* (PR) pada manusia memiliki dua isoform, yaitu *progesteron receptor A* (PRA) dan *progesterone receptor B* (PRB). PRA dan PRB berfungsi sebagai aktivasi ligan faktor transkripsi, PRA juga dapat terlibat dalam menghambat aktivitas *estrogen receptor* (ER) dan *co-transfection* PRA, ER dan gen reporter *estrogene-sensitive* menunjukkan penurunan *transactivation* ER. Studi imunohistokimia pada sel epitel dan sel stroma endometrium membuktikan bahwa ekspresi reseptor progesteron PRAB dan PRB tidak ada perbedaan yang signifikan pada pengguna DMPA dengan amenorea maupun *prolonged bleeding*, akan tetapi ada penurunan PRA dan PRB pada pengguna DMPA dengan perdarahan dibandingkan dengan wanita yang tidak mengalami perdarahan (Loockwood *et al.*, 2000; Sereepapong *et al.*, 2004).

Pemberian estrogen eksogen diharapkan dapat mencegah kerugian pada kondisi hipoestrogen yang ditimbulkan oleh DMPA. Akan tetapi pemberian estrogen sintetik pada jangka panjang dapat menimbulkan efek negatif. Namun demikian, pemberian fitoestrogen dapat digunakan sebagai alternatif yang diberikan selama penggunaan DMPA. Fitoestrogen adalah senyawa turunan dari tumbuhan yang mempunyai kemampuan yang sama dengan estrogen. Fitoestrogen diklasifikasikan sebagai isoflavon, coumestans dan lignan.

Fitoestrogen kelompok dari isoflavon terdiri dari genestein dan deidzein. Fitoestrogen memiliki afinitas mengikat yang signifikan terhadap reseptor estrogen baik α dan β (ER α dan ER β), meskipun jauh lebih lemah daripada estradiol. Afinitas pengikatan genestein dan deidzein pada fitoestrogen untuk ER β lebih tinggi dibandingkan dengan ER α . Efek dari fitoestrogen telah terbukti menjadi agonis atau antagonis tergantung pada konsentrasinya sendiri atau konsentrasi

estrogen lingkungan (Kim & Park, 2012).

Salah satu tanaman yang mengandung banyak isoflavon adalah bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) atau disebut juga sebagai *Yam bean*. Produk olahan

bengkuang umumnya digunakan dalam industri kosmetik seperti produk pemutih, bedak maupun produk kecantikan lainnya. Berbagai macam manfaat bisa didapatkan dari olahan bengkuang. Kandungan isoflavon dalam ekstrak

bengkuang memiliki struktur kimia menyerupai 17β -estradiol dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen. Sehingga ekstrak bengkuang dapat digunakan sebagai

alternatif dalam terapi pada defisiensi estrogen seperti *Hormone Replacement*

Therapy (HRT) pada menopause (Primiani, 2015). Hasil dari isolasi dan identifikasi

senyawa kimia dari ekstrak bengkuang menunjukkan bahwa dari 100 g ekstrak

bengkuang didapatkan kandungan isoflavon berupa deidzein sebanyak 110,454

mg dan genestein sebanyak 165,530 mg (Lukitaningsih, 2009 & Primiani, 2013).

Berbagai penelitian pemanfaatan fitoestrogen dalam ekstrak bengkuang telah

dilakukan dan menunjukkan hasil yang positif bagi perkembangan terapi medis.

Penelitian oleh Primiani (2015) menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak

bengkuang dapat meningkatkan proliferasi folikel sekunder dan tersier pada

histologi ovarium, serta peningkatan proliferasi kelenjar uterus pada periode

premenopausal. Sehingga hal ini membuktikan bahwa kandungan deidzein dan

genestein pada ekstrak bengkuang dapat digunakan sebagai alternatif terapi

pengganti hormon pada wanita pre dan postmenopause. Tingginya kandungan

fitoestrogen terutama deidzein dan genestein pada ekstrak bengkuang diharapkan

dapat digunakan sebagai pengganti estrogen. Selain itu keunggulan lain dari

ekstrak bengkuang adalah tidak adanya kandungan purin dibandingkan produk

olahan kedelai, sehingga mengurangi risiko terhadap penyakit *gout* dan

hyperuricemia (Messina *et al.*, 2012). Kandungan deidzein yang tinggi pada

bengkuang juga memberikan dampak yang positif terhadap penurunan kadar

asam urat dan trigliserida dalam darah (Qin et al., 2014).

Penggunaan bengkuang sebagai fitoestrogen dan berbagai potensinya terhadap kesehatan, terutama efek positifnya terhadap organ reproduksi wanita dapat digunakan sebagai terapi pengganti yang efektif dan lebih efisien, karena bengkuang lebih mudah ditemukan dengan nilai ekonomis yang lebih terjangkau serta pengolahannya yang mudah. Selain itu, belum ada penelitian efek fitoestrogen ekstrak bengkuang pada reseptor progesteron dan sel stroma endometrium tikus yang diinjeksi DMPA. Berdasarkan dari uraian tersebut peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian fitoestrogen bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi dengan DMPA.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi *Depot Medroxy Progesterone Acetat* (DMPA)?

Sub rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1.2.1. Apakah pemberian DMPA dapat menurunkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi

DMPA?

1.2.2. Apakah pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah sel stroma pada endometrium tikus wistar yang

diinjeksi DMPA?

1.2.3. Apakah pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus

wistar yang diinjeksi DMPA?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dapat meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi *Depot Medroxy Progesterone Acetat* (DMPA).

1.3.2. Tujuan khusus

1. Menganalisis hubungan pemberian DMPA terhadap penurunan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.
2. Menganalisis hubungan pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap peningkatan jumlah sel stroma pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.
3. Menganalisis hubungan pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap peningkatan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi literatur dalam bidang pendidikan atau sebagai studi pustaka untuk penelitian terkait pengaruh pemberian ekstrak bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap jumlah sel stroma endometrium dan reseptor progesteron pada tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

1.4.2. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi rujukan dalam membuat tikus model hipoestrogen dengan pemberian injeksi DMPA selain dilakukan dengan

ovariektomi pada hewan coba. Selain itu, pemberian terapi ekstrak bengkuang dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengkaji terapi alternatif yang lebih efektif dalam memperbaiki siklus menstruasi dan mempercepat pemulihan kesuburan selama penggunaan *Depot Medroxy Progesterone Acetat* (DMPA).

1.4.3. Manfaat Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan bengkuang dapat menjadi alternatif untuk meningkatkan pengembalian kesuburan yang lebih cepat pada wanita dan perbaikan kondisi pasca penggunaan kontrasepsi hormonal suntik DMPA.



BAB 2

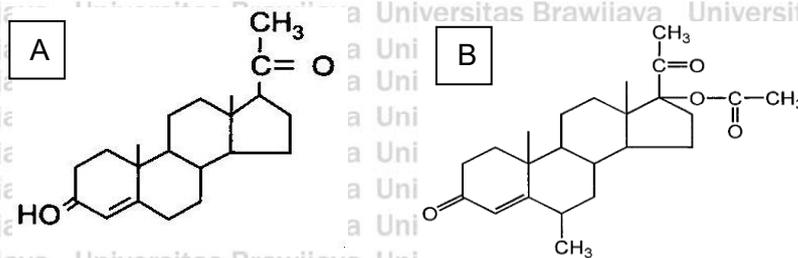
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. DMPA (*Depot Medroxyprogesterin Acetat*)

2.2.1. Definisi

Depot Medroxyprogesterin Acetat (DMPA) atau Depo Provera adalah 6-*alfa*-medroksiprogesteron yang merupakan kontrasepsi parenteral, mempunyai efek progestogen yang kuat dan sangat efektif. DMPA merupakan salah satu progesteron sintetis yang dikembangkan dengan tujuan awal sebagai pengobatan endometriosis, abortus habitualis dan ancaman abortus. Namun, pada perkembangannya pemberian DMPA diketahui dapat menunda kesuburan dan digunakan sebagai kontrasepsi yang reversibel, memiliki efek jangka panjang, efektif, aman dan memiliki efek samping yang sedikit (*Family Planning Division Ministry of Health and Family Welfare Government of India*, 2016).

DMPA diberikan secara injeksi intramuskular (IM) dengan sediaan 150 mg setiap 3 bulan atau 12 minggu pada wanita. DMPA juga tersedia dalam formulasi pemberian secara subkutan yaitu depo-suQ provera 104TM (DMPA-sc) dengan *auto disable syringe in Uniject system* dan dosis 104/0,65 mL yang memiliki efektivitas yang sama dengan DMPA IM. Setelah 1 minggu penyuntikan DMPA akan tercapai kadar puncak, lalu kadarnya tetap tinggi selama 2-3 bulan, dan akhirnya menurun setelah 3 bulan (Hartanto, 2004; Kohn *et al.*, 2018). Gambar 2.1 berikut adalah rumus bangun dari struktur progesteron dan progestin pada DMPA:



Gambar 2.1 Gambar rumus bangun progesteron dan rumus bangun progestin pada DMPA

Keterangan : Gambar A merupakan rumus struktur progesterone, gambar B merupakan rumus bangun progestin pada DMPA. Perbedaan struktur kimia progestin dengan progesteron hanya terletak pada gugus metil dan gugus asetat pada karbon nomor 17. Perbedaan tersebut membuat aktivitas dari efek progestin menjadi lebih tinggi jika dibandingkan dengan progesteron yang diberikan secara oral (Wahyuni, 2017).

DMPA tidak mengandung estrogen, sehingga aman digunakan untuk wanita dengan berat badan berlebih atau obesitas dan berisiko untuk penyakit *Deep Vein Trombosis* (DVT) (Gordon, *et al*, 2007). Menurut *Food and Drug Administration* (FDA) penggunaan DMPA termasuk dalam daftar kotak hitam pada tahun 2004 karena DMPA memberikan efek samping potensial dari kondisi hipoestrogenik pada tulang menyebabkan penurunan *Bone Mineral Density* (BMD) terutama jika diberikan selama ≥ 2 tahun (Curtis & Martin, 2006; Kaunitz & Grimes, 2011; Pfizer, 2009). Hal ini berbanding terbalik dengan pernyataan dari WHO yang merekomendasikan penggunaan DMPA tidak ada pembatasan terhadap durasi penggunaannya pada wanita usia 18-45 tahun, sehingga peringatan dari FDA dapat dihapuskan (WHO, 2005; Kaunitz & Grimes, 2011).

2.2.2. Mekanisme Kerja

Menurut *Family Planning Division Ministry of Health and Family Welfare Government of India* (2016) mekanisme kerja kontrasepsi suntik DMPA adalah melalui:

1. Menghambat ovulasi, dengan cara menekan puncak siklus pertengahan LH dan FSH;

2. Penebalan lendir serviks, akibat dari rendahnya estrogen. Lendir yang tebal mencegah sperma untuk penetrasi ke saluran reproduksi bagian atas;
3. Penipisan lapisan endometrium, akibat kadar progesteron tinggi dan kondisi estrogen yang menipis membuat dinding endometrium tidak menguntungkan untuk implantasi ovum yang dibuahi.

Mekanisme kerja utama DMPA adalah dengan cara mencegah kehamilan terutama melalui penekanan ovulasi dan menghambat perkembangan folikel pada ovarium dengan cara menurunkan frekuensi GnRH yang dilepaskan oleh hipotalamus, dan menyebabkan penurunan terhadap pelepasan FSH dan LH oleh hipofisis anterior. Penurunan kadar FSH menghambat perkembangan folikel dan mencegah peningkatan estradiol. Berkurangnya umpan balik positif estrogen dan efek dari umpan balik progestogen mencegah terjadinya pelepasan LH dan mencegah lonjakan LH yang kemudian menghambat terjadinya ovulasi (El Fattah, 2014). Produksi LH dan FSH berperan dalam pengaturan umpan balik negatif oleh hormon-hormon steroid (Norwitz & Schorge, 2007).

2.2.3. Keamanan dan Efektivitas

DMPA merupakan kontrasepsi yang aman dan efektif bagi wanita, serta dapat digunakan pada wanita yang sedang menyusui atau yang tidak memenuhi syarat untuk menggunakan kontrasepsi oral kombinasi yang mengandung estrogen. Tingkat kegagalan DMPA 0,2% pada tahun pertama kemudian dapat meningkat mencapai 6% pada penggunaan yang salah atau tidak konsisten.

Kegagalan dari kontrasepsi karena DMPA diberikan secara berulang setiap 3 bulan, sehingga jika pengguna tidak konsisten terhadap waktu suntik dapat mempengaruhi kinerja dari metode ini (RANZCOG, 2015).

Penelitian oleh WHO menunjukkan bahwa penggunaan DMPA memberikan efek perlindungan yang kuat terhadap kanker endometrium, tidak ada peningkatan

risiko kanker payudara, namun memiliki resiko yang sama dengan kontrasepsi oral pada kanker ovarium dan serviks. Selain itu, DMPA tidak menyebabkan perubahan signifikan pada tekanan darah atau sistem koagulasi fibrinolotik yang berhubungan dengan trombosis. Penggunaan DMPA dapat menjaga kesuburan tetap utuh, meskipun pada beberapa wanita membutuhkan beberapa bulan (4 hingga 6 bulan) lebih lama untuk mendapatkan kehamilan setelah menghentikan DMPA dibandingkan dengan metode kontrasepsi lainnya (*Family Planning Division Ministry of Health and Family Welfare Government of India, 2016*).

2.2.4. Keuntungan DMPA

Keuntungan dari DMPA dibandingkan dengan metode kontrasepsi hormonal lainnya adalah tidak terpengaruh oleh obat-obat yang merangsang enzim hati bersamaan, seperti pada beberapa terapi antikonvulsan. Pada beberapa penelitian ditemukan bahwa DMPA dapat mengatasi disminorea dan pada beberapa kasus telah digunakan sebagai terapi endometriosis, kanker ovarium dan episode akut penyakit radang panggul (Hickey & Fraser, 1995; RANZCOG, 2015).

DMPA juga memiliki manfaat kesehatan nonkontrasepsi yang dilaporkan dalam berbagai penelitian. DMPA dapat mengurangi resiko terhadap beberapa penyakit pada organ reproduksi wanita dan beberapa penelitian juga menunjukkan adanya pengaruh yang positif DMPA digunakan sebagai terapi pengobatan salah satunya adalah pengobatan terhadap kasus endometriosis. Tabel 2.2 menyajikan manfaat kesehatan nonkontrasepsi dari DMPA.

Tabel 2.1. Manfaat Kesehatan Nonkontrasepsi dari Depot-medroxyprogesterone Acetate (DMPA)

No	Manfaat Kesehatan Nonkontrasepsi
1.	Penggunaan DMPA dapat mengurangi risiko sebagai berikut: <ol style="list-style-type: none"> Kanker endometrium Anemia defisiensi besi Penyakit radang panggul Kehamilan ektopik Leiomioma uterus
2.	Penggunaan DMPA dapat mempengaruhi hal-hal berikut ^a : <ol style="list-style-type: none"> Menorrhagia/dysmenorrhea Gejala sindrom pramenstruasi Nyeri pada wanita dengan endometriosis Kejang refrakter terhadap antokonvulsan konvensional Hemoglobinopati Endometrium hiperplasia Gejala vasomotor pada wanita menopause Nyeri panggul/dispareunia berasal dari ovarium <i>posthysterectomy</i>^b Metastasis kanker payudara Metastasis kanker endometrium^c

Sumber : Kaunitz (2007)

Keterangan :

- Penggunaan DMPA untuk indikasi selain kontrasepsi atau kanker endometrium merupakan penggunaan *off-label* yang tidak disetujui oleh *United State Food and Drugs Administration*
- Praktek yang diakui secara klinis
- Indikasi yang disetujui untuk suntikan DMPA mengandung 400 mg/mL *medroxyprogesterone acetate*.

2.2.5. Efek Samping DMPA

Penggunaan DMPA memiliki beberapa efek samping terhadap tubuh seperti sakit kepala, peningkatan berat badan, pusing, nyeri abdomen dan gelisah.

Gangguan menstruasi merupakan masalah utama dari penggunaan DMPA.

Gangguan menstruasi atau *irregular bleeding* terjadi sekitar 93,60% pada wanita,

selain keluhan peningkatan berat badan, *bone pain*, dan kering vagina (Speroff &

Fritz, 2005; Veisi & Zangeneh, 2013). Selain itu, DMPA juga memiliki kekurangan

terhadap kembalinya kesuburan setelah pemberhentian hingga satu tahun,

penundaan ini bervariasi pada setiap wanita. Menurut Haider & Darney (2007) hal

ini berkaitan dengan masa aktif DMPA yang membutuhkan waktu 6 hingga 8 bulan

untuk menghilang dalam tubuh dan lebih lama pada beberapa wanita.

Penggunaan DMPA juga berhubungan dengan peningkatan berat badan, dan penurunan kepadatan mineral tulang atau BMD (*Bone Mineral Density*) (RANZCOG, 2015).

Penelitian oleh Dr. Sikkha Rani (2017) yang meneliti efek DMPA terhadap 250 wanita *postpartum* menunjukkan hasil bahwa DMPA memiliki efek samping yang beragam pada setiap wanita. Pada penggunaan DMPA terjadi peningkatan berat badan pada wanita signifikan terjadi setelah 6 bulan penggunaan DMPA dan akan terus meningkat seiring dengan lama penggunaan DMPA. DMPA terbukti memberikan efek penurunan HDL sebanyak 15-20% tetapi kisaran umumnya tetap dalam batas normal. Tidak ada peningkatan terhadap tekanan darah, gula darah, dan gangguan fungsi hati selama pengamatan. Akan tetapi DMPA tidak dianjurkan untuk digunakan terhadap wanita dengan hipertensi >180/110 mmHg dan juga penderita diabetes. Karena dilaporkan bahwa DMPA dapat berpengaruh terhadap keburukan dari penyakit tersebut. Efek samping yang paling dominan dalam penelitian ini adalah perubahan menstruasi yaitu amenorea sekitar 50% pada tahun pertama dan mengalami peningkatan menjadi 70% pada tahun berikutnya dan perdarahan tidak teratur sekitar 70% pada tahun pertama dan berkurang sekitar 10% pada tahun berikutnya.

Paparan progesteron sintetik mempengaruhi semua bagian sel pada endometrium dan akan mengakibatkan timbulnya gangguan menstruasi. Gangguan tersebut terjadi karena perubahan pada vaskular, stroma, dan interaksi epitel selama siklus menstruasi normal. Kerapuhan lokal pada endometrium, integritas struktur vaskular, perfusi jaringan dan perubahan angiogenesis merupakan penyebab terjadinya gangguan menstruasi (Hickey dan Fraser, 2012). Gangguan menstruasi yang terjadi pada pengguna DMPA meliputi *no bleeding* (tidak ada perdarahan/*spotting* selama periode menstruasi), *prolonged bleeding* (perdarahan ≥ 10 hari pada 1 episode menstruasi), *frequent bleeding* (<4

episode selama 90 hari siklus menstruasi), *infrequent bleeding* (<2 periode dalam 90 hari siklus menstruasi), dan *irregular bleeding* (rentang lamanya tidak ada perdarahan berubah-ubah dengan interval <17 hari dalam 90 hari siklus menstruasi (Pamuji, dkk, 2008; Hickey & Fraser, 2012).

Pada pemakaian DMPA jangka panjang akan mengakibatkan kerusakan struktur dan fragilitas vaskular. Penelitian oleh Stephanie, *et al.* (2007) dalam Wahyuni (2016) menunjukkan bahwa hasil biopsi pada endometrium wanita yang menggunakan progestin menunjukkan banyak pembuluh darah yang immatur.

Sedangkan penelitian oleh Nelson (2010) pada wanita pengguna DMPA USG transvaginal menunjukkan adanya hubungan antara perdarahan (*irregular bleeding*) dengan perfusi uterus dan vaskular pada endometrium. Disamping itu peran radikal bebas juga turut berperan dalam meningkatkan stress oksidatif dan menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan DNA dan protein. Sehingga pada akhirnya mengakibatkan kerusakan sel dan merubah struktur endometrium serta kerapuhan pada vaskular (Subakir, dkk, 2000; Lockwood, 2011).

2.2. Uterus

Organ reproduksi wanita terdiri dari uterus, serviks, vagina, ovarium dan tuba falopii. Uterus berbentuk seperti buah pir dan secara anatomis terbagi menjadi 3 lapisan yaitu: lapisan luar yang tipis serosa adalah perimetrium, lapisan tengah dan tebal adalah myometrium dengan struktur otot polos, dan lapisan mukosa bagian dalam adalah endometrium. Uterus sangat responsif terhadap hormon ovarium, dimana endometrium setiap bulan secara siklik bersiap untuk menerima hasil fertilisasi dari sel telur dan sperma (Berger, 2017). Uterus berperan terhadap siklus menstruasi dan kehamilan.

2.3.1. Siklus Menstruasi

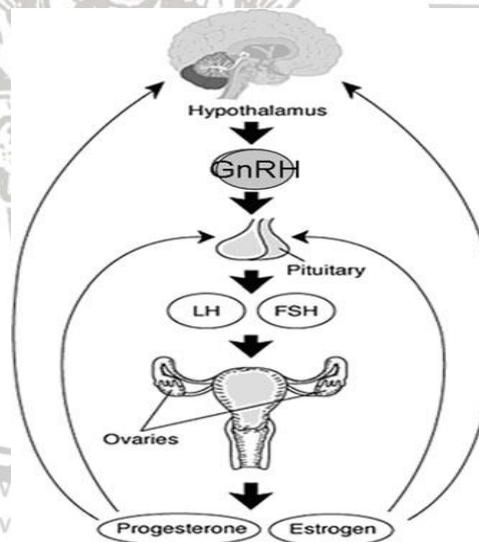
Perempuan memiliki panjang usia reproduksi rata-rata 36 tahun, dimulai saat menarche pada 8,5-13 tahun hingga mencapai menopause sekitar usia 51 tahun. Masa pubertas membutuhkan waktu 2-3 tahun, dimulai dengan perkembangan payudara yang diikuti oleh pertumbuhan rambut di kemaluan dan pertumbuhan rambut aksila kemudian diakhiri dengan *menarche* (periode menstruasi pertama) (Harlow, 2000; Park *et al.*, 2002; Aydos *et al.*, 2005).

Siklus menstruasi merupakan persiapan bagi tubuh wanita untuk kemungkinan kehamilan. Siklus ini terjadi setiap bulan selama bertahun-tahun reproduksi wanita (dari pubertas hingga menopause). Siklus menstruasi normal manusia biasanya berlangsung sekitar 25 hingga 32 hari, umumnya 28 hari. Setiap tahapan menstruasi pada wanita usia 19-42 tahun terdiri dari fase folikel dengan durasi 14,6 hari dan fase luteal dengan durasi 13,6 hari. Namun lama atau panjang durasi dari setiap tahapan siklus menstruasi dan jumlah perdarahan dari setiap siklus bervariasi pada setiap wanita bervariasi. Perdarahan menstruasi adalah gejala eksternal dari siklus pada wanita yang terjadi pada akhir fase luteal dan awal fase folikular. Pada 80% wanita perdarahan menstruasi terjadi selama 3-6 hari dengan durasi terberat pada hari ke-2 dan rata-rata kehilangan darah 33,2 ml (10-84 ml). Durasi panjangnya siklus dan jumlah perdarahan menstruasi tergantung pada usia, berat badan, diet, jumlah aktivitas fisik wanita, tingkat stres, etnis, regional, sosial ekonomi dan faktor genetika. (Mtawali *et al.*, 1997; Harlow, 2000; Mihm *et al.*, 2010).

2.3.2. Fisiologi Hipotalamus, Pituitari dan Ovarium

Hipotalamus, hipofisis atau pituitari, dan ovarium membentuk suatu aksis endokrin (dikenal sebagai sumbu HPO) yang berfungsi melalui regulasi hormonal dan mekanisme umpan balik. Sistem ini mengatur regulasi pada siklus

menstruasi, yang merupakan perubahan siklik dan teratur dari lapisan uterus. Hipotalamus pada sistem saraf pusat mengeluarkan GnRH dan dibawa menuju hipofisis anterior untuk menstimulasi gonadotrof. sel-sel akan menanggapi rangsangan dengan mensintesis, menyimpan dan mensekresikan gonadotropin (FSH dan LH). Level dan waktu sekresi setiap gonadotropin dikorelasikan oleh GnRH, umpan balik dari hormon seks steroid, serta faktor autokrin dan parakrin lainnya sebagai inhibin dan aktivin. Selanjutnya hormon ini merangsang gonad untuk mensintesis hormon seks steroid. Pelepasan hormon di sumbu HPO diatur oleh umpan balik negatif pada gonadotropin di hipofisis anterior dan dengan inhibisi tidak langsung pada tingkat hipotalamus. Stimulasi dan penghambatan negatif merupakan keseluruhan dari jalur antara hipotalamus, hipofisis dan ovarium (Speroff & Fritz, 2005; Hawkins & Matzuk, 2008; Popat *et al.*, 2008). Gambaran dari regulasi sumbu HPO pada siklus menstruasi ada pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Regulasi hipotalamus, pituitari dan ovarium pada siklus menstruasi.

Keterangan : Regulasi dari siklus menstruasi dimulai dengan mempengaruhi hipotalamus, untuk melepaskan GnRH kemudian hipotalamus menstimulasi pituitari anterior untuk mensintesis, menyimpan dan mensekresikan FSH dan LH. Selanjutnya FSH dan LH menstimulasi ovarium. Organ terakhir yang dipengaruhi hormon sex adalah endometrium. Siklus menstruasi diregulasi oleh *feedback* hormon seks steroid dengan gonadotropin dan *cross-talk* antara komponen-komponen atau organ yang berbeda tersebut (Popat *et al.*, 2008).

2.3.3. Endometrium

Endometrium adalah salah satu organ yang paling sensitif untuk hormon steroid ovarium. Permukaan endometrium terdiri dari satu lapisan kolumnar yang memiliki silia dan kelenjar sekresi mukosa rahim. Secara normal sel stroma dan kelenjar akan mengalami perubahan sesuai dengan siklus menstruasi yang terjadi, lapisan endometrium akan mengalami mengelupas dan regenerasi kembali setiap 28 hari (Speroff & Fritz, 2005). Endometrium memiliki 2 (dua) lapisan yang terdiri dari lapisan basal yang berdekatan dengan myometrium dan lapisan atas fungsional keluar lumen uterus dengan permukaan epitel diatas. Lapisan fungsional sangat sensitif dan responsif terhadap fluktuasi hormonal ovarium dan menampilkan perubahan proliferaatif, sekresi dan degeneratif siklik, dimana pada akhirnya terjadi perubahan selama menstruasi. Sedangkan lapisan basal dipertahankan setelah menstruasi dan merupakan sumber regenerasi endometrium selanjutnya. Endometrium terdiri dari beberapa tipe sel menurut Berger (2017), terdiri dari:

1. Sel epitel

Sel-sel epitel endometrium membentuk satu lapisan kolumnar melapisi permukaan luminal dan kelenjar. Sel-sel epitelium luminal ditutupi oleh molekul glikokaliks pelindung. Sel-sel epitel kelenjar mensekresi faktor penting autokrin dan parakrin untuk pematangan endometrium serta implantasi embrio.

2. Sel stromal

Sel-sel stromal terletak dikompartemen stromal seperti jaringan ikat, yang sebagian besar terdiri dari proteoglikan dan kolagen. Sel-sel seperti fibroblast ini menghasilkan matriks ekstraseluler, termasuk berbagai protein seperti matriks metalloproteinase dan jaringan penghambat metalloproteinase serta faktor pertumbuhan dan sitokin. Selama persiapan implantasi, seluruh sel stroma terjadi peningkatan edema dan sel-sel stroma menjadi kurang padat.

Selanjutnya sel-sel stroma terletak bersebelahan dengan arteri spiral endometrium yang penting untuk angiogenesis selama siklus menstruasi dan kehamilan pada saat ovulasi, sel-sel stroma mencapai maksimum mitosis dan semakin mendekat dengan fase menstruasi, sedangkan pada periode peri-implantasi stroma akan menurun secara nyata.

3. Leukosit

Endometrium mengandung populasi substansial leukosit yang bervariasi selama siklus menstruasi normal dan kehamilan. Namun mekanisme ini tidak sepenuhnya difahami, akan tetapi diyakini melibatkan interaksi antara hormone steroid dan faktor-faktor yang diproduksi oleh endometrium, serta dari sel trofoblas selama kehamilan. Leukosit endometrium terletak didalam stroma dan jenis leukosit utama adalah *uterine Natural Killer* (uNK), makrofag dan limfosit T. sel NK pada uterus merupakan populasi utama pada sekretor endometrium saat tidak hamil dan juga pada desidua selama awal kehamilan. Pada siklus normal endometrium, sel NK berproliferasi dan terakumulasi dalam stroma postovuatori, dengan peningkatan dari fase midsekretori sebagai respon terhadap progesterone yang bersirkulasi dan melalui awal kehamilan jika terjadi. Pengaruh progesterone tidak langsung karena sel NK tidak memiliki reseptor progesterone.

4. Sel punca (*stem cell*)

Sel punca atau sel induk berada di lapisan basal endometrium dengan kapasitas intrinsic meregenerasi lapisan fungsional dan epitel permukaan setiap bulan selama masa reproduksi.

5. Sel endothelial

Sel-sel endotel dalam pembuluh darah endometrium diregulasi oleh kadar hormon estrogen dan hormon progesterone pada setiap fase yang berbeda selama siklus menstruasi. Angiogenesis memiliki peran utama dalam siklus

menstruasi selama peristiwa regenerasi dan pematangan endometrium.

Angiogenesis berlanjut selama fase sekresi ketika arteri spiral tumbuh dan melilit, serta pada pengembangan pleksus kapiler subepitel. Sehingga endometrium menjadi kaya vaskularisasi waktu implantasi. Sel-sel endotel mengekspresikan ER β dan distimulasi untuk tumbuh responsive terhadap estrogen. Namun sel endotel tidak mengekspresikan PR, meskipun menunjukkan respon terhadap penarikan progesteron. Hal ini diyakini disebabkan oleh faktor parakrin yang dimediasi oleh sel stroma yang dekat dengan pembuluh darah.

Pertumbuhan dan karakteristik fungsi endometrium adalah hal yang unik.

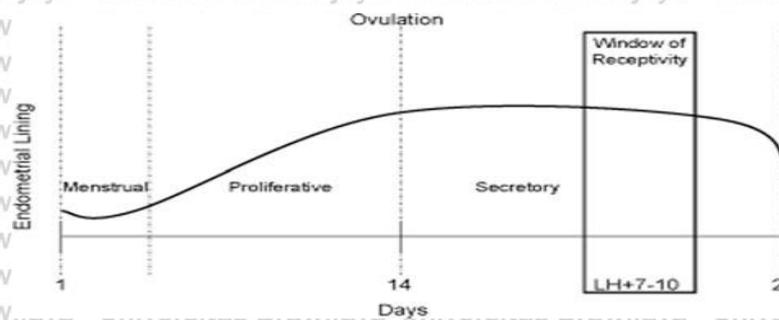
Pada wanita usia subur, sel-sel epitel (kelenjar), sel-sel stroma (mesenkim) dan pembuluh darah mengalami replikasi secara siklis dengan kecepatan tinggi.

Endometrium mengalami hampir 500 kali regenerasi keseluruhan endometrium selama masa subur. Endometrium dapat berfungsi sebagai akomodasi kehamilan.

Fungsi fisiologis dan metabolik dari endometrium/desidua adalah sebagai penghubung jaringan maternal dalam kehamilan. Endometrium dan arteri spiralis menerima invasi trofoblas dan mempersiapkan nutrisi bagi mudigah janin (Cunningham, 2006).

2.3.4. Siklus endometrium

Fase pada siklus endometrium dibagi menjadi 3, yaitu fase proliferaatif sesuai dengan tahapan folikel di ovarium, fase sekresi, dan sesuai dengan fase luteal di ovarium. Berikut adalah Gambar 2.3 representasi dari endometrium dari keseluruhan siklus menstruasi:



Gambar 2.3 Perubahan lapisan endometrium sepanjang siklus menstruasi

Keterangan : Lapisan endometrium menanggapi hormon steroid dari ovarium (estrogen dan progesteron) sepanjang siklus menstruasi. Lapisan endometrium menanggapi estrogen pada fase proliferasi akan menebal. Setelah ovulasi, endometrium akan menjadi desidualis pada fase sekresi. Waktu yang dibutuhkan untuk menerima implantasi dari hasil pembuahan adalah 7-10 hari setelah lonjakan LH dekat waktu ovulasi. Jika tidak terjadi pembuahan dan implantasi maka setelah siklus selesai, menstruasi terjadi dan siklus dimulai lagi (Hawkins & Matzuk, 2008).

Berdasarkan Gambar 2.3 tersebut selama siklus menstruasi, hari pertama menstruasi dianggap hari ke-1. Selama fase menstruasi, endometrium mengalami perubahan dan meluruh karena kadar estrogen yang rendah. Fase proliferasi adalah periode waktu dari fase menstruasi ke ovulasi. Ketika kadar estrogen mulai meningkat, lapisan endometrium menebal, memberikan pola proliferasi. Estrogen menyebabkan proliferasi sel stroma dan kelenjar, serta elongasi dari arteri spiralis. Fase terakhir adalah fase sekresi yang berasal dari ovulasi sampai dengan menstruasi. Setelah ovulasi, tingkat progesteron mulai meningkat pada tahap sekresi awal. Hal ini menyebabkan sekresi glikogen dan lendir. Pada fase sekretorik, endometrium menjadi terekstradisi dan menerima embrio yang dibuahi. Pada akhir fase sekresi, tanpa adanya kehamilan dan dengan penurunan estrogen dan progesteron, arteri spiralis mengalami vasokonstriksi sehingga menyebabkan involusi endometrium. Kemudian siklus kembali mengulang dari awal (Speroff & Fritz, 2005).

Endometrium mengalami perubahan seluler dan struktural yang penting untuk fungsinya. Perubahan ini bersifat siklus dan dikendalikan oleh produksi estrogen dan progesteron oleh ovarium. Penampilan ultrasonografi dari

endometrium berbeda tergantung pada fase siklus menstruasi. Lapisan fungsional endometrium pada dua pertiga bagian atas mengalami perubahan karakteristik selama fase proliferasi, sekresi dan degenerasi. Endometrium menjadi tipis pada beberapa hari pertama dari siklus menstruasi, setelah menstruasi ketebalannya kurang dari 4 mm. Selama fase folikuler, lapisan epitelium (kelenjar luminal) dan mesenkimal (stroma dan pembuluh darah) endometrium berproliferasi sebagai respon terhadap estrogen. Kemudian menjadi sekresi dalam menanggapi progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Dalam siklus normal ketebalan endometrium berkisar antara 6 mm hingga 12 mm pada fase folikuler akhir. Ketebalan endometrium mencapai puncak 5 hari setelah lonjakan LH dengan rata-rata 14 mm. *Withdrawl* estradiol dan progesterone menyebabkan *breakdown* pada endometrium berakhir dengan perdarahan, peluruhan dan pelepasan sel (menstruasi). Berhentinya perdarahan menstruasi terjadi karena re-epitelisasi epitelium luminal, melalui proliferasi yang cepat pada kelenjar dan sel epitel luminal oleh faktor pertumbuhan lokal dan kemudian oleh estradiol endogen (Jurkovic, *et al.*, 2009; Dinh, *et al.*, 2015).

Pada fase proliferasi kelenjar dan pembuluh darah menjadi berliku-liku dan melampaui stroma. Respon endometrium yang dipengaruhi estrogen dibagi menjadi 3 fase sekretorik, yaitu awal, pertengahan dan akhir. Pada fase sekresi awal (2-5 hari pasca ovulasi) ditandai dengan adanya vakuola subnukleus pada lebih dari 50% sel kelenjar epitel dan diikuti oleh sekresi ke dalam kelenjar lumen. Arteriola mulai tumbuh dengan konfigurasi spiral melebihi lapisan fungsional. Pada fase sekresi pertengahan (5-9 hari pasca ovulasi) kelenjar menggulung dengan sekresi luminal, dilapisi oleh epitelium oleh *nonvacuolated* epitel dengan nucleus yang bulat dan vasikular. Fase sekresi akhir (10-14 hari pasca ovulasi) ditandai dengan predecidualisasi stroma dan infiltrasi stroma oleh granuloosa, arteri spiralis menonjol dan pembesaran sel-sel yang pada awalnya pembuluh darah muncul

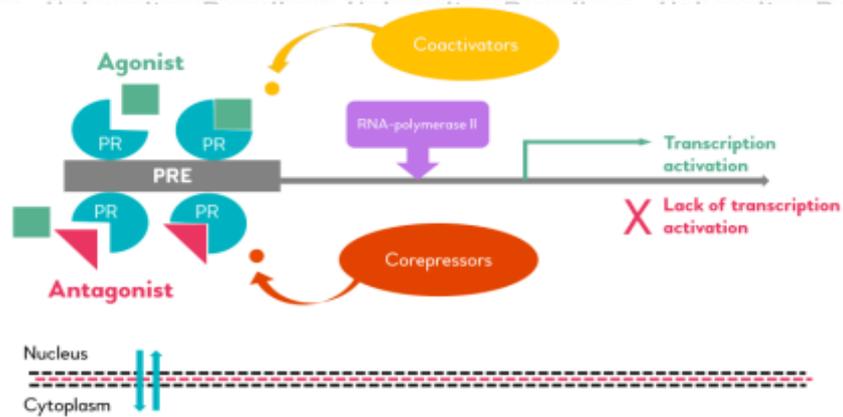
distroma dan diidentifikasi sebagai perubahan awal atau prakondisi. Perubahan seluler ini, mencerminkan sekresi progesterone yang berlanjut, meluas dan akhirnya menjadi konfluen (Dinh, *et al.*, 2015).

2.3. Reseptor Progesteron

Hormon steroid progesteron, bertindak melalui reseptor selnya, berperan penting selama ovulasi. Reseptor progesteron dengan cepat diinduksi dalam sel granulosa folikel preovulasi mengikuti lonjakan LH. Pada penelitian dengan hewan coba *PR-null mice* yang merupakan tikus model yang digunakan untuk mengeksplorasi jalur PR yang mendasari proses ovulasi. PR diketahui memiliki ligan yang menginduksi faktor transkripsi untuk mengontrol ovulasi dengan mengatur ekspresi jaringan unik pada *downstream gene*. Terdapat 3 gen baru, *adisintegrin and metalloprotease with thromboxan motif 1 (ADAMTS-1)*, *cyclic GMP-dependent protein kinase II (cGKII)* dan *synaptosome-associated protein 25 (Snap25)*, sebagai mediator potensial fungsi PR di ovarium. Selain itu, *endothelin-2 (ET-2)* yang diinduksi pada folikel preovulasi berperan dalam pengaturan terjadinya ruptur folikuler. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa gen *peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* merupakan kandidat dari regulasi gen reseptor progesteron selama proses ovulasi. Penghapusan dari gen PPAR γ dalam ovarium dapat menyebabkan kerusakan pada folikel dan mengakibatkan terjadinya ruptur folikel. Hasil metabolit dari COX berfungsi sebagai pengaktifan ligan PPAR γ selama proses ovulasi, dan merupakan jalur kunci dari pengaturan ovulasi. Selain itu, PPAR γ juga dapat meregulasi gen *downstream* termasuk gen-gen encoding ET-2, *interleukin-6 (IL6)*, dan cGKII yang memediasi sebagian efek penting dari PR selama ovulasi (Kim, *et al.*, 2008).

2.5.1. Struktur dan Fungsi PRA dan PRB

Progesteron mengontrol pertumbuhan endometrium manusia sebagai antagonis dari aktivitas proliferasi estradiol melalui induksi diferensiasi sel epitel endometrium dan sel-sel stroma. Reseptor progesteron pada manusia terdiri dari 2 isoform, yaitu PRA dan PRB. Kedua isoform ini diterjemahkan dari gen yang sama, tetapi transkripsi dimulai dari promotor yang berbeda. PRA adalah bentuk PRB yang terpotong, pengurangan terjadi pada 164 asam amino pertama pada N-terminus. Meskipun kedua isoform memiliki afinitas mengikat DNA dan ligan yang serupa, PRA dan PRB menunjukkan sifat pengaktifan yang berbeda. Baik PRA maupun PRB merupakan domain fungsional yang memiliki 2 aktivitas fungsi transkripsi yang sama yaitu AF-1 dan AF-2, dan satu domain penghambatan. AF-3 merupakan penghambat *transactivation* pada domain PRB. Pada endometrium normal manusia, ekspresi PRA mendominasi sel stroma sepanjang siklus menstruasi, sedangkan sel epitel terjadi pergeseran dari PRA ke PRB selama fase awal sekresi. Rasio dari kedua isotipe bervariasi pada sel target yang berbeda dan dibawah keadaan fisiologis yang berbeda menunjukkan bahwa diferensial tingkat ekspresi PRA dan PRB dapat menentukan respon seluler terhadap progesteron. *Down regulation* pada PRA dan PRB diketahui berkaitan dengan konsekuensinya terhadap kanker endometrium. Hasil penelitian secara *invivo* membuktikan bahwa ada pengaruh progestagen dan dua tipe isotipe PR pada invasi dan metastasis sel kanker endometrium (Hanekamp *et al.*, 2003). Aktivasi dari reseptor progesterone dijelaskan pada Gambar 2.4 berikut:



Gambar 2.4 Aktivasi progesterone receptor (PR) oleh ligan hormon progesteron

Keterangan: Progesteron mengikat reseptornya dalam sitoplasma sel dan menyebabkan dimerisasi serta perubahan konformasi membentuk kompleks PR yang kemudian mentranslokasikan ke dalam inti sel. Selanjutnya aktivasi PR diinisiasi oleh adanya ligan *coactivator* sehingga terjadi aktivasi transkripsi pada gen target. Sebaliknya kehadiran dari antagonis PR sebagai *corepressor* dapat menghambat aktivasi transkripsi pada gen target. PRE (*Progesterone Receptor Element*) (Berger, 2017).

2.5.2. Peran Reseptor Progesteron Terhadap Fungsi Reproduksi

Reseptor progesteron terbukti berperan penting terhadap aktivitas reproduksi dan non reproduksi wanita. Pada hewan coba tikus betina yang tidak memiliki baik PRA dan PRB menunjukkan perilaku gangguan seksual, gangguan regulasi gonadotropin neuroendokrin, anovulasi, disfungsi uterus dan gangguan percabangan morfogenesis duktus dan diferensiasi lobuloalveolar dari kelenjar susu. PR juga memainkan peran penting dalam regulasi involusi timus selama kehamilan dan dalam sistem kardiovaskular melalui pengaturan sel endotelial dan proliferasi sel otot halus, serta respon vaskular terhadap cedera vaskular. Reseptor progesteron juga telah diidentifikasi dalam sistem saraf pusat dan tulang dimana progesteron terlibat dalam fungsi kognitif dan pemeliharaan tulang (Conneely et al., 2003). Terdapat beberapa peran reseptor progesteron terhadap aktivitas reproduksi yaitu:

1. Reseptor progesteron dan fungsi ovarium

Progesteron berasal dari ovarium dan berpartisipasi dalam regulasi

autokrin pada fungsi ovarium pertama yang muncul dengan adanya LH, sinyal primer adalah pecahnya folikel ovarium preovulasi yang memicu terjadinya ovulasi. Hal ini dapat merangsang ekspresi sementara mRNA dan protein reseptor progesteron dalam sel granulosa yang diisolasi dan membentuk folikel preovulasi. PR merupakan mediator penting pada ovulasi, dimana PR berhubungan dengan ruptur folikel yang tergantung LH pada saat preovulasi. Rupturnya folikel juga berhubungan dengan aktivasi gen-gen pada folikel yang berkontribusi melalui jalur pensinyalan reseptor progesteron selama proses ovulasi (Conneely *et al.*, 2003).

2. Reseptor progesteron dan perkembangan uterus

Progesteron bereperan penting dalam proses implantasi uterus selama tahap awal kehamilan dan merupakan inhibitor ampuh dari *E-induced hyperplasia* dari epitelium uterus. Proses implantasi diatur oleh progesteron termasuk persiapan epitel uterus untuk menerima implantasi blastokista dan diferensiasi sel-sel stroma endometrium ke fenotip desidua yang mendukung perkembangan implantasi embrio. Jalur pensinyalan molekuler yang memediasi respon progesteron dependen dimediasi oleh reseptor progesteron. PR diekspresikan dalam epitel, stroma dan kompartemen miometrium uterus, dan ekspresi dari PR diatur baik oleh estrogen maupun progesteron yang mengalami perubahan dinamis selama siklus estrus dan awal kehamilan. Induksi dari estrogen dependen dengan PR didalam stroma sangat penting untuk memediasi efek antiproliferatif PR pada epitel uterus.

Baik PRA maupun PRB diekspresikan setara pada uterus (Conneely *et al.*, 2003).

3. Reseptor progesteron pada perkembangan kelenjar payudara

Reseptor progesteron berkaitan dengan proliferasi duktus terkait kehamilan dan diferensiasi lobuloalveolar epitel *mammae*. Peran PR pada

kelenjar *mammæ* sebagai proliferaatif berbeda dengan peran PR terhadap efek antiproliferaatifnya pada uterus. Selama masa pasca pubertas perkembangan kelenjar, PR diekspresikan secara eksklusif pada epitelium. Perkembangan dari tahap remaja ke dewasa ekspresi PR pada epitel mengalami perubahan pola menjadi tidak seragam dan terkolonisasi pada subset sel epitel yang tersebar sepanjang epitel duktus dewasa (Conneely *et al.*, 2003).

4. Reseptor progesteron dengan morfogenesis kelenjar *mammæ* selama kehamilan

Baik PRA dan PRB diekspresikan pada kelenjar air susu dan selama kehamilan, dengan rasio perbandingan PRA dan PRB yaitu 2:1. PRB berperan terhadap proliferasi normal dan diferensiasi epitel payudara dalamanggapi progesteron, sedangkan PRA tidak terlibat pada proses ini. PRA dapat membatasi efek merugikan progesterin terhadap proliferasi kelenjar *mammæ* bila diberikan dalam kombinasi dengan estrogen dalam terapi penggantian hormon (Conneely *et al.*, 2003).

2.4. Pengaruh DMPA pada Endometrium dan Progesterone Receptor

Pemberian progesteron eksogenous berupa kontrasepsi DMPA dapat mengganggu *peak* (puncak) kadar FSH dan LH, sehingga tidak terjadi ovulasi dan mengganggu produksi progesteron oleh korpus luteum menjadi berkurang.

Kondisi ini dapat menyebabkan endometrium mengalami keadaan istirahat jika digunakan secara sistemik jangka panjang (Hartanto, 2004). Penggunaan obat-

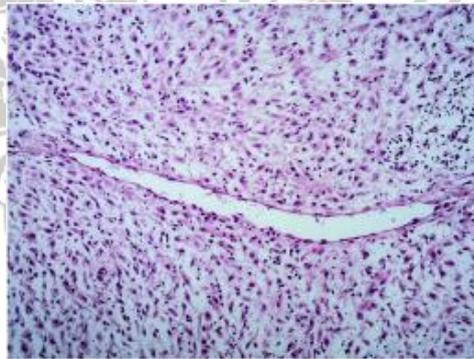
obatan yang bersifat estrogenik maupun progestogenik akan mempengaruhi hasil penampilan dari ultrasonografi endometrium, termasuk pada penggunaan kontrasepsi DMPA. Kontrasepsi dengan hanya progestogen mencegah kehamilan melalui beberapa kombinasi mekanisme. Mekanisme utamanya adalah

mengganggu fungsi hypothalamus-hipofisis dan menekan ovulasi. Pemberian dosis rendah tidak mengganggu ovulasi akan tetapi dapat mempengaruhi lender serviks yang akan mengganggu sperma saat penetrasi. Efek progestogen saja terhadap endometrium bervariasi, yaitu terjadi atrofi, penekanan proliferasi, dan kadang-kadang aktivitas normal. Pada pemeriksaan histologi, kelenjar endometrium berkurang jumlah dan diameternya. Perubahan ini menghasilkan tampilan endometrium yang tipis (Jurkovic, *et al.*, 2009).

Perubahan endometrium yang disebabkan oleh progestogen yang berlangsung terus menerus mengakibatkan perdarahan yang tidak teratur dan sering terjadi sejak awal paparan dan cenderung menurun seiring waktu. Pola perdarahan yang terganggu dengan penggunaan kontrasepsi progesteron jangka panjang mencerminkan perubahan dalam pembuluh endometrium, perubahan hemostasis, gangguan dukungan vaskular, angiogenesis abnormal, perubahan proteolysis dalam matriks ekstraseluler (ECM), gangguan untuk perbaikan endometrium atau kombinasi dari faktor-faktor ini. Pemberian kontrasepsi yang mengandung progesteron akan merubah morfologi dari endometrium sesuai dengan jenisnya (Hickey dan Salomonsen, 2008).

Variasi pemberian progestogen memberikan respon endometrium yang berbeda terhadap steroid seks tergantung pada jenis dan rute pemberiannya, contohnya pada pemberian LNG-IUS kadar progestogen yang tinggi pada endometrium menekan ekspresi PR. Sedangkan pada penggunaan implant sebaliknya, jumlah ekspresi PR meningkat. Reseptor estrogen ditemukan tidak berubah ekspresinya pada penggunaan Implanon atau DMPA, akan tetapi berkurang pada Norplant yang mengandung (LNG). Penggunaan progestogen juga mempengaruhi pembuluh darah pada endometrium. Perdarahan yang tidak teratur berkaitan dengan pengembangan arteriol spiral yang dibatasi dan rusaknya pembuluh kapiler dan vena superfisial. Beberapa studi terkait efek progestogen

terhadap pembuluh darah menunjukkan bahwa progestogen dapat meningkatkan diameter dan kerapuhan pembuluh darah. Perubahan morfologi vaskular menyebabkan perubahan fungsi vascular atau angiogenesis abnormal. Progesteron juga mempengaruhi perfusi dan oksigenasi endometrium. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan pola vasomotion normal menjadi hilang (vasomotion menggambarkan dilatasi spontan dan ritme serta penyempitan pembuluh darah mikro). Hipoperfusi pada endometrium berhubungan dengan keadaan hipoksia pada pembuluh darah dan pelepasan agen vasoaktif yang merangsang angiogenesis seperti faktor pertumbuhan vaskuler endotel (VEGF) dan angiopoietin-2 (Ang-2) (Hickey dan Salomonsen, 2008). Berikut adalah Gambar 2.5 histologi dari lapisan stroma endometrium pada pemberian progestin (LNG-IUS; Mirena).



Gambar 2.5 Morfologi sel stroma dan pembuluh darah endometrium terhadap pemberian progestin

Keterangan : Gambar menunjukkan stroma mengalami perubahan desmua yang konfluen. Pembuluh darah ber dinding tipis dan *ectatic* (dilatasi), serta ditemukan sel-sel limfoid (leukosit) (Dinh, *et al.*, 2015).

DMPA menginduksi perubahan endometrium setelah 6 bulan pertama penggunaan stroma menampilkan efek progestasional, akan tetapi penggunaan lebih lanjut menyebabkan atrofi endometrium. DMPA menurunkan kepadatan pembuluh darah endometrium yang terdiri dari pembuluh darah mikro yang ber dinding tipis. Wanita yang menggunakan DMPA ditemukan mengalami peningkatan jumlah leukosit di endometrium yang berhubungan dengan

perdarahan yang tidak terjadwal dibandingkan dengan amenore, hal ini menunjukkan adanya peradangan pada perdarahan yang tidak terjadwal (Dinh, *et al.*, 2015).

Penelitian oleh Choksuchat, *et al.* (2009) tentang efek progesteron, levonorgesrel dan medroksiprogesteron asetat (MPA) terhadap apoptosis pada sel endothelial endometrium (HEECs) menunjukkan bahwa pemberian progesterone (MPA) menyebabkan apoptosis sel endotel pada pemeriksaan dengan meningkatnya ekspresi Bax dan menurunnya ekspresi Bcl-2 setelah 24 dan 48 jam. Sel endotel berperan penting dalam pemeliharaan pembuluh darah dan homeostasis pembuluh darah. Penelitian serupa menunjukkan bahwa pemberian DMPA mempengaruhi vaskularisasi dan aliran darah arteri uterina subendometrium yang ditunjukkan oleh penilaian terhadap indeks pulsasi (PI) dan indeks resistensi (IR) yang lebih tinggi dan vaskularisasi subendometrium yang lebih rendah pada penggunaan DMPA dibandingkan dengan LNG-IUS (Dane, *et al.*, 2009).

Penggunaan DMPA juga berpengaruh terhadap reseptor progesteron dan estrogen pada endometrium. Hal ini karena perbedaan dalam lingkungan hormonal yang terjadi selama penggunaan DMPA. Secara normal kadar estradiol dalam sirkulasi yang tinggi pada fase proliferasif siklus menstruasi menginduksi sintesis *progesteron receptor A* (PRA) dan *progesterone receptor B* (PRB), sedangkan progesteron pada fase sekresi mengatur penurunan PRA dan PRB (Graham dan Clarke, 1997; Mote *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2001). Dengan kondisi estrogen yang rendah dan progesteron yang tinggi selama penggunaan DMPA akan berdampak terhadap perdarahan pada endometrium dan atau amenorea akibat perubahan dari reseptor estrogen dan progesteron. Penelitian oleh Sereepapong *et al.* (2004) memberikan hasil bahwa ekspresi *progesterone receptor AB*, *progesteron receptor B*, *estrogen receptor a*, dan *estrogen receptor*

b baik pada kelenjar dan stroma yang mengalami amenorea dengan kelenjar dan stroma dari pengguna DMPA yang mengalami gangguan perdarahan berkepanjangan tidak berbeda. Namun, pada penelitian lain yang membandingkan antara wanita biasa dengan wanita yang menggunakan DMPA menunjukkan adanya pengurangan yang cukup signifikan pada ekspresi reseptor progesteron. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perubahan terhadap reseptor progesteron baik PRA dan PRB berpengaruh terhadap efek samping dari DMPA terutama perdarahan berkepanjangan maupun amenorea.

Hasil penelitian lain pada penggunaan DMPA terhadap reseptor progesteron dan estrogen akibat perubahan yang terjadi pada hormon steroid progesteron dan estrogen juga memberikan hasil bahwa DMPA dapat meningkatkan reseptor progesteron di tuba fallopi tetapi terjadi penurunan pada sel epitel stroma uterus. Kondisi ini mempengaruhi fungsi tuba fallopi. Progesteron telah terbukti menyebabkan aktivitas silia pada tuba fallopi berkurang dan mungkin pada tingkat tinggi dapat menyebabkan kehamilan ektopik. Silia dari epitel oviduk bersama dengan kontraksi otot dan cairan folikel berperan penting terhadap transportasi sperma, oosit dan juga proses pembuahan. Perubahan hormon steroid dapat menyebabkan perubahan fungsi dari silia dan berpengaruh terhadap keberhasilan pembuahan (Hegazy dan Hegazy, 2015).

2.5. Ekstrak Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

Bengkuang (*Pachyrhizus erosus* (L) Urban) atau dalam istilah bahasa Inggris disebut *Yam bean* adalah sebuah tanaman keluarga *Leguminosae*, subfamili *Papilinoideae* yang kurang dimanfaatkan. Bengkuang mudah diolah, dengan siklus pertumbuhan sekitar 6-8 bulan (dari penanaman bibit hingga panen). Spesies *Pachyrhizus erosus* telah dikembangkan di beberapa negara seperti Meksiko, Brasil, Amerika Serikat, China, Indonesia, Filipina, Nigeria, Thailand dan

Malaysia (Mélo *et al.*, 1994). Pemanfaatan terhadap tanaman bengkuang yang telah diteliti diantaranya adalah pada biji dan umbi akarnya. Biji bengkuang mengandung tiga jenis rotenoid yakni *pachyrhizin*, *rotenone*, dan *erosone*. *Rotenone* terlibat dalam penghambatan pengangkutan elektron mitokondria hewan dan tumbuhan. Beberapa penelitian telah menemukan tentang efek toksisitasnya pada hewan coba tikus dan efek ekstrak biji bengkuang pada sel KB (sel-sel yang berasal dari karsinoma nasofaring manusia yang digunakan sebagai penilaian untuk agen antineoplastik) (Tang *et al.*, 2008). Gambaran tanaman Bengkuang ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Bengkuang *Pachyrhizus erosus* (Reddy, 2015)

Umbi dari Bengkuang merupakan jenis tumbuhan populer dari akar yang dapat dimakan dan banyak tumbuh di daerah tropis serta subtropis, khususnya di Indonesia. Umbi Bengkuang berkulit sawo matang, berdaging putih, renyah dan *juicy* dengan bentuk bulat yang tidak beraturan. Bengkuang baik mentah ataupun matang dapat dikonsumsi dalam banyak jenis olahan hidangan. Beberapa kandungan yang dapat dikonsumsi dari umbi Bengkuang adalah kandungan 82,0% air, 14,9% karbohidrat, 1,2% dari protein, 0,1% lemak, dan 1,4% serat kasar (Noman *et al.* 2007).

2.6. Efek Fitoestrogen Ekstrak Bengkuang terhadap DMPA

Fitoestrogen adalah senyawa turunan dari tumbuhan yang mempunyai kemampuan yang sama dengan estrogen. Fitoestrogen diklasifikasikan sebagai isoflavon, coumestans dan lignan. Fitoestrogen memiliki afinitas mengikat yang

signifikan terhadap reseptor estrogen baik α dan β (ER α dan ER β), meskipun jauh lebih lemah daripada estradiol. Afinitas pengikatan genestein untuk ER β adalah 87%, sedangkan untuk ER α adalah 4%. Sementara itu untuk deidzein perbandingan afinitasnya adalah 0,5% dan 0,1% untuk ER β dan ER α . Efek dari fitoestrogen telah terbukti menjadi agonis atau antagonis tergantung pada konsentrasinya sendiri atau konsentrasi estrogen lingkungan (Kim & Park, 2012).

Yam bean atau umbi bengkuang mengandung isoflavon senyawa dengan struktur kimia seperti estrogen. Struktur isoflavon kimia menyerupai 17 β -estradiol dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen sehingga *yam bean* juga termasuk dalam kelompok *phytoestrogen*. Komponen terbesar dari isoflavon adalah genistein dan daidzein yang sering ditemukan dalam famili *Fabaceae*, termasuk *Pachyrhizus erosus*. *Pachyrhizus erosus* setidaknya mengandung isoflavon seperti, daidzein dan genistein (Primiani, 2013), analisis HPLC daidzein dan genistein dari *yam bean* adalah 110.454 mg / 100 g dan 165.530 mg / 100 g masing-masing. Struktur kimia genistein dan daidzein bisa mengikat reseptor estrogen dan bersaing dengan estrogen endogen sehingga mereka dapat memberikan baik efek estrogenik maupun efek anti-estrogenik. Pemanfaatan *yam bean* lainnya oleh Nurrochmad *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak umbi Bengkuang dengan dosis 400 mg/kg dan 800 mg/kg dosis selama 4 minggu pada tikus yang diovariectomi dapat mencegah pengeroposan tulang, phytoestrogen kemudian terbukti dapat meningkatkan massa uterus.

Genistein mempengaruhi peningkatan berat rahim dengan merangsang penebalan endometrium uterus. Genistein dosis 26,6 mg/hari ekuivalen dengan manusia dosis 0,625 mg/hari dalam 6 bulan pada penyebab pematangan vagina (Marquez *et al.*, 2012). Hasil penelitian oleh Primiani (2015) membuktikan bahwa pemberian ekstrak fitoestrogen dalam bengkuang selama 24 hari dapat memicu terjadinya proliferasi folikel sekunder dan tersier karena antrum mengandung

sejumlah estrogen yang cukup. Sementara itu, jaringan endometrium uterus mengalami proliferasi kelenjar uterus, sehingga Bengkuang dapat digunakan sebagai sumber estrogen alami.

2.7. *Rattus Norvegicus*

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai *Norway rat* merupakan hewan percobaan yang sering digunakan pada penelitian biomedis, pengujian, dan pendidikan. Hal ini dikarenakan genetik yang terkarakteristik dengan baik, galur yang bervariasi dan tersedia dalam jumlah yang banyak. Tikus untuk kepentingan penelitian atau laboratorium merupakan jenis albino yang kehilangan pigmen melaninnya, sifat tersebut menurun pada anak-anaknya (Barnett, 2001). Gambar 2.7 merupakan jenis tikus *Rattus norvegicus* galur wistar yang biasa digunakan dalam penelitian. Taksonomi dari tikus putih adalah sebagai berikut (Maley dan Komasa 2003):

Kingdom : *Animalia*

Divisi : *Chordata*

Kelas : *Mammalia*

Ordo : *Rodentia*

Famili : *Muridae*

Subfamili : *Murinae*

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.7 *Rattus norvegicus*, galur wistar (Fauziah, 2016)

Jenis tikus yang paling umum digunakan adalah jenis albino galur Sprague Dawley (SD), Wistar, dan Long Evans. Galur SD dan Wistar merupakan *outbred stocks* yang merujuk pada hewan yang secara genetik tidak identik atau tidak seragam. Perkawinan antara tikus dilakukan secara acak atau dengan cara menerapkan skema rancangan perkawinan. Hal ini dilakukan untuk menghindari akibat dari *inbreeding* yaitu menjaga keragaman genetik dan mencegah terjadinya stres. Beberapa keuntungan dari penggunaan *outbred stocks* antara lain rentang hidup yang panjang, resistensi terhadap penyakit yang tinggi, ukuran yang besar, pertumbuhan dan fertilitas yang cepat (Suckow et al., 2006).

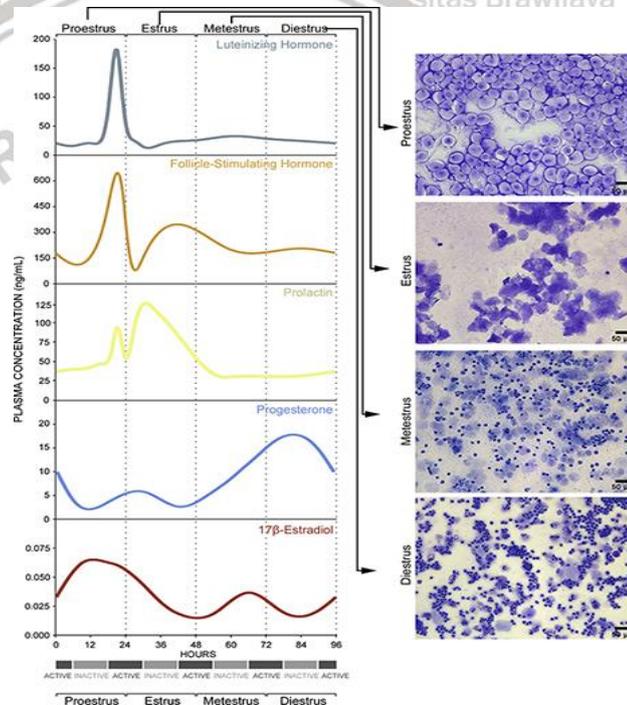
2.9.1. Siklus Reproduksi Tikus

Siklus estrus pada tikus terdiri dari empat fase yang yaitu fase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus. Selama tahap proestrus, tingkat estrogen meningkat dan folikel ovarium tumbuh cepat, pada fase ini berlangsung sekitar 12 jam (hal ini sesuai dengan fase folikuler pada manusia). Ovulasi terjadi selama malam estrus 10-12 jam setelah lonjakan LH. Apabila saat ovulasi tidak terjadi pembuahan, corpus luteum akan mengeluarkan progesteron, fase ini disebut metestrus dan berlangsung sekitar 21 jam (sesuai dengan tahap sekresi luteal pada manusia) (Maeda et al., 2000; Lohmiller, 2006; Johnson, 2007).

Peningkatan estrogen atau $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ secara tidak langsung merangsang neuron hormon melepaskan gonadotropin di hipotalamus dan septum yang pada gilirannya mengaktifkan sel responsif di hipofisis anterior untuk melepaskan LH dan FSH kedalam sirkulasi. Pada fase proestrus apusan vagina yang diambil dari hewan coba, sel-sel secara eksklusif berinti oval. Puncak kadar FSH memberi sinyal ovulasi dan masuk ke fase estrus. Selama fase estrus, kadar estrogen menurun dan kadar prolaktin mencapai puncaknya. Kemudian masuk ke metestrus, bertepatan dengan peningkatan kadar hormon progesteron terus

menerus hal ini berhubungan dengan awal fase luteal pada manusia. Ketika progesteron mulai meningkat dan akan disertai lonjakan kecil estradiol dalam menanggapi aktivasi korpus luteum. Jenis sel pada fase ini merupakan sel epitel kornifikasi dan leukosit. Fase terakhir adalah diestrus pada tikus dan progesteron mencapai puncak sesuai dengan fase luteal akhir pada manusia. Reresi dari korpus luteum menyebabkan penurunan tajam level progesteron selanjutnya.

Pada fase ini sel leukosit yang dominan hadir pada apusan vagina (McLean, 2012). Gambar 2.8 adalah siklus estrus pada hewan coba tikus.

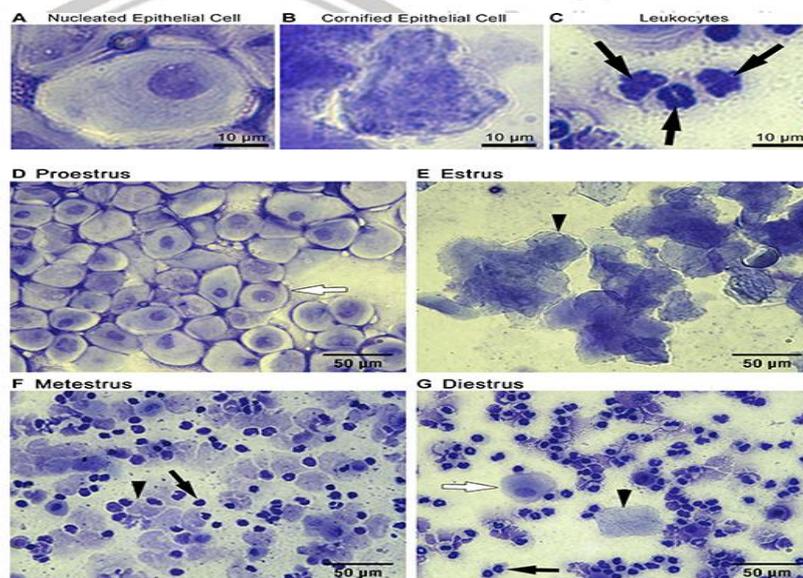


Gambar 2.8 Siklus estrus pada hewan coba

Keterangan : Siklus estrus pada tikus terbagi menjadi 4 fase yaitu, fase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus. Setiap fase memiliki regulasi hormon seks steroid (estrogen dan progesteron) dan gonadotropin (FSH dan LH) yang berbeda sesuai dengan siklusnya. Gambaran dari setiap siklus juga ditunjukkan dengan hasil apusan sel epitel vagina, dimana setiap fase memiliki karakteristik epitel yang berbeda-beda (McLean, 2012).

Untuk pemeriksaan terhadap siklus estrus pada tikus dilakukan dengan pemeriksaan sitologi, dimana pada sampel apusan vagina terdapat 3 jenis sel primer yang dapat dideteksi, yaitu: sel epitel nukleus/berinti, sel skuamosa

cornified (bertanduk), leukosit. Se-sel epitel berinti memiliki sitoplasma bernoda terang, membran plasma berwarna gelap, dan berinti oval. Sel epitel skuamosa kornifikasi (sel tanduk) memiliki warna yang seragam, lebih berbentuk poligonal daripada sel epitel sebelumnya dan tidak memiliki inti. Sedangkan leukosit polimorfonuklear dapat dibedakan dari sel epitel dengan bentuknya yang tidak beraturan, nukleus polimorfik berwarna gelap dan berukuran kecil (McLean, *et al.*, 2012). Kehadiran sel-sel tersebut pada setiap fase ditunjukkan pada Gambar 2.9 berikut:

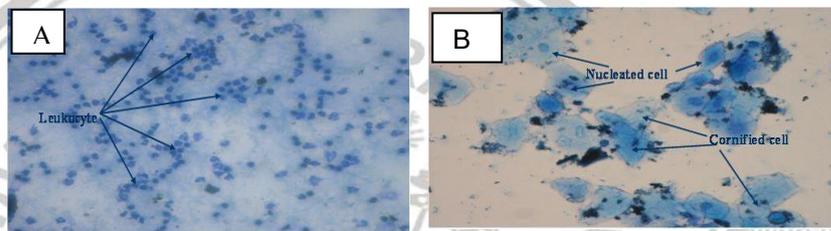


Gambar 2.9 Penilaian sitologi vagina pada siklus estrus

Keterangan : Pada hasil *smear*/apusan vagina terdapat 3 jenis sel utama yaitu (A) sel epitel berinti/nuklear, (B) sel epitel skuamosa bertanduk (kornifikasi), dan (C) adalah sel leukosit. Rasio jenis sel pada hasil smear ini untuk mengidentifikasi siklus estrus pada tikus. Gambar (D) fase proestrus, (E) fase estrus, (F) fase metestrus, (G) diestrus. Panah hitam di E, F, dan G mengarah pada keberadaan sel epitel skuamosa kornifikasi. Panah hitam pada C, F, dan G merupakan leukosit, dan padanah putih pada D dan G menunjukkan sel epitel berinti (mtwal, 2012).

Representasi dari hasil apusan vagina dapat digunakan sebagai perbandingan kondisi siklus estrus normal pada tikus dengan kondisi hipoestrogen seperti pada tikus model menopause atau model ovariektomi. Secara normal pada kondisi estrogen yang tinggi pada fase proestrus dan estrus ditunjukkan dengan penebalan pada sel epitel vagina dengan jenis sel epitel beinti hal ini dipengaruhi

oleh adanya peningkatan estrogen. Sedangkan pada tikus menopause atau ovariectomi dimana terjadi penurunan kadar estrogen plasma setelah 2 minggu ovariectomi dan hal ini menyebabkan atrofi pada jaringan yang bergantung pada vagina termasuk epitel vagina. Pada fase diestrus tidak ditemukan adanya sel kornifikasi tetapi ditemukan leukosit dalam jumlah yang banyak. Hasil tersebut dapat digunakan sebagai perbandingan fitur klinis penting dari defisiensi estrogen pada tikus dengan ovariectomi (Zanni, *et al.*, 2014). Gambar 2.10 berikut merupakan representasi dari kondisi tikus ovariectomi yang ditandai dengan atrofi pada hasil apusan vagina:



Gambar 2.10 Vaginal smear pada tikus ovariectomi

Keterangan : Hasil apusan vagina pada tikus ovariectomi yang ditandai dengan defisiensi estrogen ditunjukkan pada gambar A (hasil 3 minggu setelah ovariectomi) apusan vagina ditemukan sejumlah besar leukosit. Dibandingkan dengan hasil apusan vagina dengan ovariectomi yang diberikan *conjugated equine estrogen* (0,2 mg/kg) setelah 3 minggu, ditemukan adanya sel-sel epitel kornifikasi (sel epitel bertanduk) dan sedikit leukosit hal ini menunjukkan bahwa terjadi pengurangan atrofi pada epitel vagina (Pharizkar, *et al.*, 2011).

2.9.2. Perbandingan Usia Tikus dengan Usia Manusia

Teradapat beberapa metode untuk mengetahui usia mamalia kecil seperti tikus dengan menghubungkan usia pada manusia, yaitu dengan menggunakan berat lensa mata, pertumbuhan gigi geraham, perhitungan lapisan endosteal di tibia, pertumbuhan muskuloskeletal melalui penutupan dan penebalan epifisis dan lain sebagainya, tetapi semua teknik ini kurang tepat untuk mendefinisikan usia pasti dari tikus. Sehingga untuk menghubungkan usia tikus dengan usia manusia terdapat beberapa penelitian yang mendukung. Tikus laboratorium hidup sekitar

2-3,5 tahun (rata-rata 3 tahun), sementara harapan hidup manusia di seluruh dunia adalah 80 tahun. Perhitungan rentang hidup usia tikus dapat dihitung sebagai berikut $(80 \times 365) : (3 \times 365) = 26,7$ hari manusia = 1 hari tikus; dan $365 : 26,7 = 13,8$ hari tikus = 1 tahun manusia. Dengan demikian, satu tahun manusia hampir sama dengan dua minggu tikus (13,8 hari) fisiologi reproduksi pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Fisiologi umum dan data reproduksi pada *Rattus norvegicus*

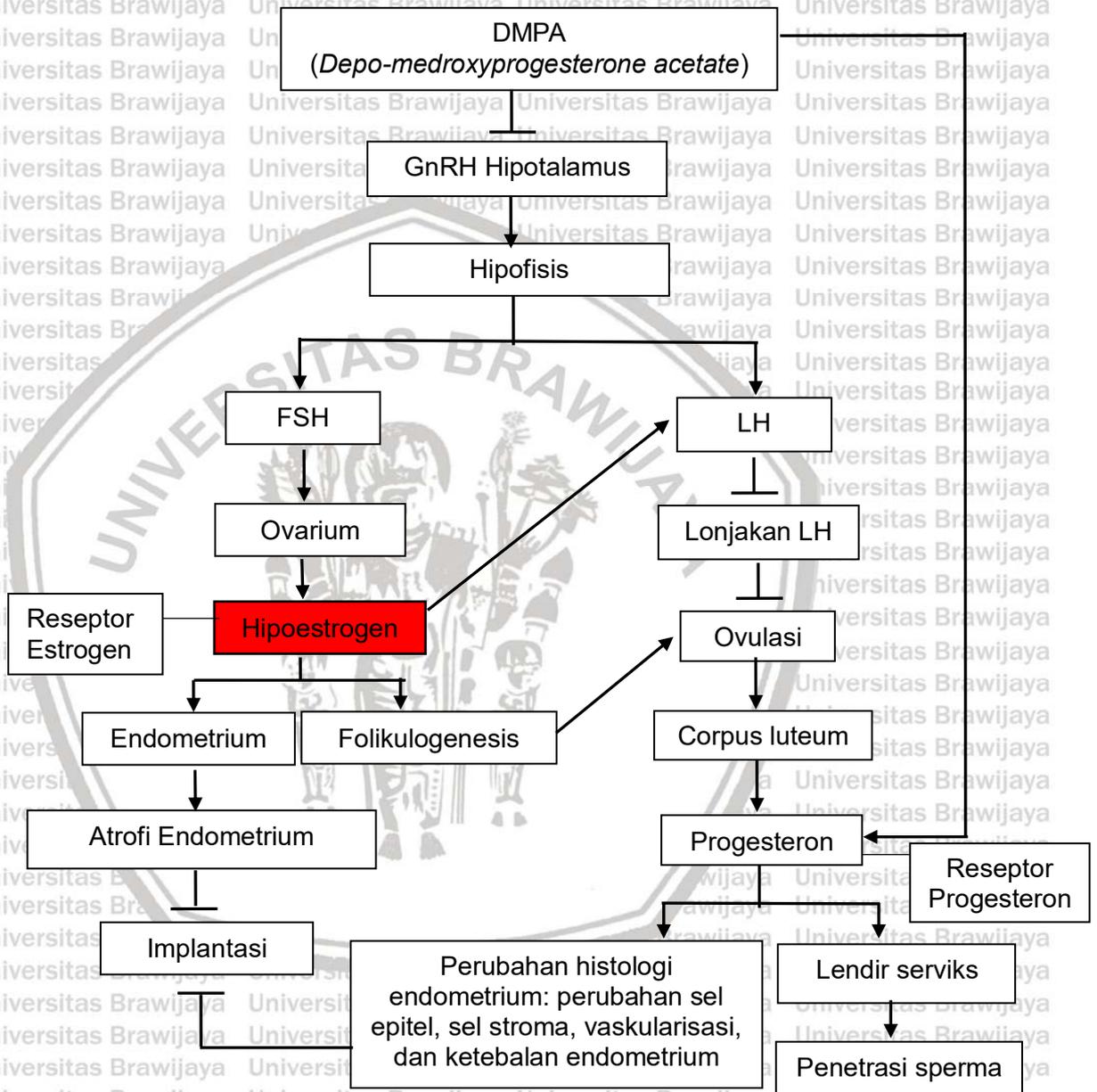
Data Fisiologi Umum	Jantan	Betina
Suhu tubuh	37°C	37°C
Rata-rata pernafasan	75-115 kali/menit	75-115 kali/menit
Rata-rata detak jantung	260-400 kali/menit	260-400 kali/menit
Konsumsi air harian	10-12 ml/100 g BB	10-12 ml/100 g BB
Konsumsi makanan harian	10 g/100 g BB	10 g/100 g BB
Ukuran panjang	6-12	6-12
Berat badan	5 g	5 g
Usia kehamilan		21 hari
Maturitas seksual	7 minggu (~P49)	7 minggu (~P49)
Durasi pembiakan	12-16 bulan	12-16 bulan
Berat jantan dewasa	450-550 g	
Berat betina dewasa		250-300 g
Masa hidup	2,5-3,5 tahun	2,5-3,5 tahun
Parameter reproduksi:		
1.Usia reproduktif	8-10 minggu	8-10 minggu
2.Berat pada usia reproduktif	250-300 g	180-225 g
3.Panjang siklus estrus	4-5 hari	4-5 hari
Durasi estrus	10-20 jam	10-20 jam
Waktu ovulasi		8-11 jam setelah estrus onset
4.Menopause		15-18 bulan
5.Kehamilan:		
a.Waktu kopulasi		Dekat dengan <i>midpoint</i> pada siklus gelap sebelumnya
b.Waktu sperma saat dideteksi di vagina		Hari pertama
c.Waktu implantasi		Setelah hari ke-5
d.Panjang gestasi		21-23 hari

Sumber : Sengupta (2013)

BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Teori



Gambar 3.1. Kerangka Teori

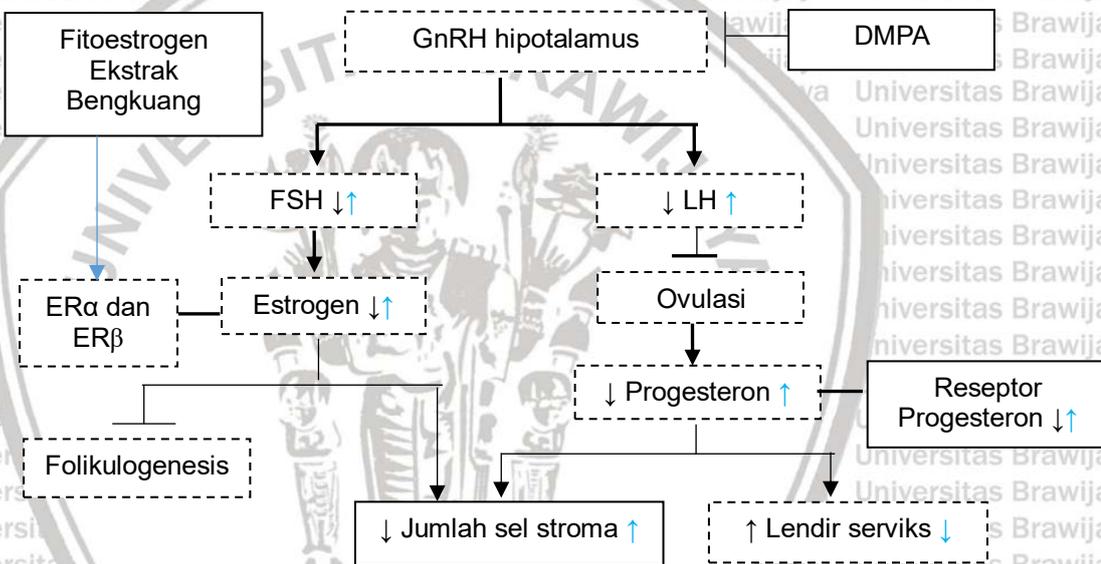
Keterangan :
 → : Mempengaruhi
 ↑ : Meningkatkan
 ↓ : Menurunkan
 ⊥ : Menghambat

DMPA berisi progestin sintesis yaitu 17-acetoxyprogesterone yang diinjeksikan kedalam tubuh akan masuk ke sirkulasi dan di metabolisme secara cepat pada manusia (Shoupe & Kjos, 2006). DMPA bekerja dengan menghambat ovulasi, meningkatkan viskositas lendir serviks dan menipiskan endometrium. Setelah di injeksikan dalam DMPA bekerja di mulai dengan menghambat GnRH di hipotalamus (Strauss & Barbieri, 2013). Hal ini mengakibatkan perubahan produksi FSH dan LH menjadi menurun. Kadar FSH dan LH yang rendah terjadi pada fase folikuler dini. FSH yang berkurang akan mengakibatkan perkembangan folikel terhambat dan tidak terbentuk folikel antral yang akan menuju tahap preovulasi. Tidak adanya folikel yang mature mengakibatkan penurunan produksi estrogen pada system reproduksi sehingga mengakibatkan terganggunya fungsi ovarium dan endometrium. Kadar estrogen yang rendah mengakibatkan efek umpan balik pada hipofise tidak dapat memproduksi LH yang cukup untuk merangsang terjadinya LH surge (Speroff & Darney, 2010).

Akibat terhambatnya lonjakan LH, serta tidak adanya telur yang matang akibat tidak terjadinya folikulogenesis maka ovulasi tidak terjadi. Apabila ovulasi tidak ada maka *corpus luteum* tidak akan terbentuk, dan kemudian tidak menghasilkan hormone progesteron alami dalam tubuh. Progestin sintetik yang disuntikan dalam tubuh akan berikatan dengan resptor progesteron dan akan memberikan sinyal kepada hipotalamus untuk menghambat pelepasan GnRH. Penggunaan DMPA juga berpengaruh terhadap reseptor progesteron dan estrogen pada endometrium, hal ini karena perbedaan dalam lingkungan hormonal yang terjadi selama penggunaan DMPA. Secara normal kadar estradiol dalam sirkulasi yang tinggi pada fase proliperatif siklus menstruasi menginduksi sintesis *progesteron receptor A* (PRA) dan *progesterone receptor B* (PRB), sedangkan progesteron pada fase sekresi mengatur penurunan PRA dan PRB (Mote *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2001).

Pengaruh DMPA terhadap penurunan hormone steroid yaitu estrogen dan progesteron serta mekanisme ikatan dengan reseptornya dapat mempengaruhi perubahan pada endometrium berupa transformasi abortif sekretorik yang lambat laun akan menjadi atrofi. Terjadinya penipisan lapisan endometrium sehingga menjadi atrofi akan menyebabkan endometrium tidak dapat menjadi tempat yang baik untuk implantasi. DMPA juga dapat menyebabkan lender serviks menjadi lebih kental sehingga menghambat saat penetrasi sperma (Nelson, 2010).

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

Keterangan :

- : Mempengaruhi
- (blue) : Pengaruh fitoestrogen Bengkuang
- ↓ : Menurun
- ↑ (blue) : Meningkatkan
- ⊥ : Menghambat
- ⊥ (blue) : Dteliti
- - - : Tidak diteliti

DMPA berisi progestin sintesis yang di injeksikan kedalam tubuh akan masuk ke sirkulasi dan di metabolisme secara cepat pada manusia (Shoupe & Kjos, 2006). Setelah di injeksikan dalam DMPA bekerja di mulai dengan menghambat

GnRH di hipotalamus (Strauss & Barbieri, 2013). Hal ini mengakibatkan perubahan produksi FSH dan LH menjadi menurun. Kadar FSH dan LH yang rendah terjadi pada fase folikuler dini. FSH yang berkurang akan mengakibatkan perkembangan folikel terhambat dan tidak terbentuk folikel antral yang akan menuju tahap preovulasi. Tidak adanya folikel yang mature mengakibatkan penurunan produksi estrogen pada system reproduksi sehingga mengakibatkan terganggunya fungsi ovarium dan endometrium. Kadar estrogen yang rendah mengakibatkan efek umpan balik pada hipofise tidak dapat memproduksi LH yang cukup untuk merangsang terjadinya LH surge sehingga tidak terjadi ovulasi (Speroff & Darney, 2010).

Rendahnya estrogen endogen atau hipoestrogen selama penggunaan DMPA menyebabkan timbulnya perbedaan lingkungan hormonal yang berpengaruh terhadap reseptor progesteron dan estrogen pada endometrium. Secara normal kadar estradiol dalam sirkulasi yang tinggi pada fase proliferasif siklus menstruasi menginduksi sintesis *progesteron receptor A* dan *progesterone receptor B*, sedangkan progesteron pada fase sekresi mengatur penurunan PRA dan PRB di endometrium (Graham dan Clarke, 1997; Mote *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2001). Reseptor progesteron yang berikatan dengan progesteron pada DMPA serta peran dari hormon estrogen yang rendah mengakibatkan perubahan pada endometrium yang mengalami transformasi abortif sekretorik yang lambat laun akan menjadi atrofi dengan ditandai perubahan dari sel-sel, kelenjar dan pembuluh darah endometrium. Penurunan terhadap sel, seperti sel stroma dan epitel akan menyebabkan endometrium tidak dapat menjadi tempat yang baik untuk implantasi (Nelson, 2010; Ramirez *et al.*, 2011). Selain itu, efek progestogen pada DMPA juga berpengaruh terhadap kekentalan lendir serviks yang meningkat sehingga akan mengganggu proses penetrasi sperma menuju uterus.

Ekstrak bengkuang mengandung fitoestrogen yang memiliki struktur kimia

menyerupai 17β -estradiol dan memiliki khasiat seperti hormon estrogen. Isoflavon dalam bengkuang merupakan salah satu klasifikasi dari fitoestrogen yang dapat digunakan sebagai terapi estrogen alternatif yang terdiri dari genestein dan deidzein. Pemberian ekstrak bengkuang yang mengandung fitoestrogen dapat memperbaiki kondisi hipoestrogen setelah penggunaan DMPA.

3.3. Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi *Depot Medroxy Progesterone Acetate* (DMPA).

3.3.1. Pemberian DMPA menurunkan jumlah sel stroma dan menurunkan reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

3.3.2. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) meningkatkan jumlah sel stroma pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

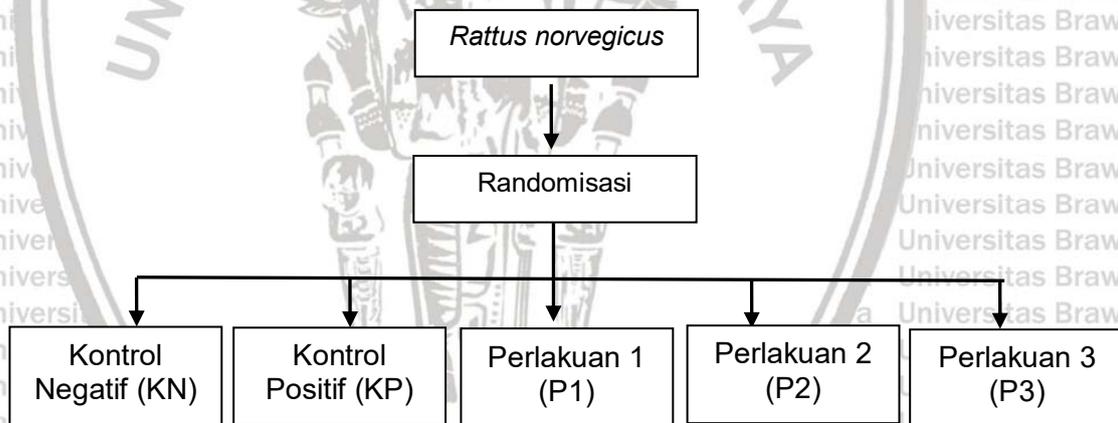
3.3.3. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) meningkatkan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus wistar yang diinjeksi DMPA.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental* yang bertujuan untuk menemukan *cause-effect relationships* diantara variabel-variabel penelitian (Sim & Wright, 2000). Ciri khas jenis penelitian ini adalah pengambilan sampel dengan cara randomisasi. Desain yang digunakan oleh peneliti adalah *post test-only control group design* dimana kelompok sampel (kelompok perlakuan dan kontrol) sama-sama dilakukan pengumpulan data dan pengukuran (observasi) yang dilakukan setelah diberi perlakuan. Hasil pengukuran pada kelompok perlakuan dan kontrol akan dibandingkan atau diuji secara statistik (Swarjana, 2012).



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

- Keterangan:
- S : Sampel penelitian tikus putih (*Rattus norvegicus*)
 - R : Randomisasi
 - KN : Kelompok kontrol negatif (tanpa dipapar DMPA dan tidak diberi ekstrak Bengkuang hanya diberi induksi aquades sebanyak jumlah pemberian DMPA agar mengalami *stressing gavage* yang sama)
 - KP : Kelompok kontrol positif (hanya diberi DMPA dengan dosis 2,7 mg setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan tanpa diberi ekstrak Bengkuang)
 - P1 : Kelompok perlakuan 1 (dipapar DMPA dengan dosis 2,7 mg (0,18 mL) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan dilanjutkan dengan pemberian

- ekstrak bengkuang dosis 70 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari)
- P2 : Kelompok perlakuan 2 (dipapar DMPA dengan dosis 2,7 mg (0,18 mL) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bengkuang dosis 140 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari)
- P3 : Kelompok perlakuan 3 (dipapar DMPA dengan dosis 2,7 mg (0,18 mL) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan dan dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bengkuang dosis 280 mg/200 g BB setiap hari selama 14 hari)

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Kriteria Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba jenis tikus putih bintina (*Rattus norvegicus*) dengan galur *Wistar* yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Penentuan sampel yang digunakan pada masing-masing kelompok dilakukan secara *random*, dengan tehnik *systematic random sampling*. Tikus putih dipilih sebagai sampel penelitian karena memiliki karakteristik baik secara genetik, biologis, serta perilaku yang mirip dengan manusia. Tikus pada penelitian ini dibuat menjadi model hipoestrogen dengan pemberian DMPA.

4.2.2. Besar Sampel

Menurut Supranto (2000) besar sampel pada penelitian *experimental* secara sederhana dapat dirumuskan berdasarkan rumus replikasi $(t - r)(r - 1) > 15$ dengan t adalah jumlah perlakuan dan r adalah jumlah replikasi.

Pada penelitian ini peneliti menetapkan 5 kelompok perlakuan, sehingga nilai r :

$$(5 - 1)(r - 1) > 15$$

$$(r - 1) > 15/4$$

$$r > 4,75 \approx 5$$

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus tersebut, didapatkan nilai 5 sehingga jumlah sampel hewan coba yang diperlukan pada masing-masing

kelompok penelitian adalah 5 ekor tikus betina galur Wistar. Jadi, besar sampel yang digunakan pada penelitian ini untuk 5 kelompok perlakuan berjumlah 25 ekor tikus.

Untuk mengantisipasi kemungkinan hewan coba mati pada kelompok penelitian diperlukan koreksi dengan sampel menggunakan rumus $1 / (1 - f)$. Huruf f pada rumus menunjukkan 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 : jenis kelamin betina, usia 8-10 minggu, berat badan 180 – 250 g, kondisi sehat dan bergerak aktif
2. Kriteria eksklusi : tikus tidak mau makan dan minum yang disediakan, tikus mati selama penelitian, dan tikus bunting.

4.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeriksaan Histopatologi dan Immunohistokimia, dan UPT Materia Medica Kota Batu untuk pembuatan ekstrak bengkuang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari – Juni 2019.

4.4. Bahan dan Alat

4.4.1. Bahan

1. Tikus betina galur *Wistar* yang diperoleh dari UD. ABADI JAYA Yogyakarta.

2. Bahan untuk pembuatan ekstrak bengkuang terdiri dari bengkuang lokal yang didapatkan dari kecamatan Kayen Kidul, Kabupaten Kediri, Jawa Timur dan pelarut etanol 96%.
3. Bahan yang diinjeksikan adalah DMPA dan *aquabidest*
4. Bahan untuk pemeriksaan apusan vagina meliputi NaCl 0,9% dan *Methylene blue* 1%.
5. Pengukuran parameter ekspresi PR menggunakan *Immunohistochemistry* (IHC) dengan *monoclonal antibody* PR (AB-52) *catalog* SC-810, EDTA.
6. Bahan untuk pembuatan slide histopatologi endometrium terdiri dari larutan formalin/PFA 4-10%, larutan alkohol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 99%, larutan *xilol*, paraffin cair, larutan *hematoxylin*, cat eosin 1%, dan *Enthellan*

4.4.2. Alat

1. Hewan coba : Keranjang tikus yang berupa *box* plastik berukuran 25 x 35 x 40 cm sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas dan ditutup dengan kawat berjaring. Masing-masing kandang ditempati 5 ekor tikus dan tempat minum
2. Neraca *Ohaus* untuk menimbang berat badan hewan coba
3. Alat untuk pembuatan ekstrak bengkuang meliputi pisau, oven, timbangan, toples, batang pengaduk, kain saring, tabung *erlenmeyer* dan *rotary evaporator*
4. Injeksi DMPA dilakukan dengan menggunakan spuit 1 cc dan jarum ukuran 27G.
5. Alat untuk pemeriksaan apusan vagina terdiri dari *cotton bud*, *object glass* dan *cover glass*, mikroskop.
6. Alat untuk pemberian ekstrak bengkuang dengan menggunakan spuit 1 cc dan *gastric tube* dengan ujung yang terbuat dari timah.

7. Alat untuk pengambilan organ ovarium dan endometrium terdiri dari toples kaca tertutup, alat bedah minor, wadah untuk penyimpanan jaringan sementara sebelum dibuat preparat histopatologi, papan untuk meja operasi.
8. Alat untuk pembuatan slide histopatologi endometrium terdiri dari, *tissue tax* prosesor, mikrotom, *waterbath*, inkubator.
9. Alat untuk pemeriksaan ekspresi PR, *object glass*, kit imunohistokimia *skytech*, *dot slide mikroskop Olympus SC 10*.
10. Alat untuk pemeriksaan jumlah sel stroma endometrium terdiri dari, *object glass*, *cover glass*, *dotslide Microscope Olympus SC 10*

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel Bebas

Pemberian dosis ekstrak bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

4.5.2. Variabel Tergantung

1. Jumlah sel stroma
2. Ekspresi reseptor progesteron

4.6. Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional Penelitian

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Data	Satuan
DMPA	Kontrasepsi yang berisi 150 mg hormon progesteron sintetik yang diberikan ke tikus secara injeksi intramuskuler dengan dosis 2,7 mg (0,18 mL) setiap 3 hari sebanyak 4 kali penyuntikan. Pemberian dosis disesuaikan dengan pemberian DMPA pada wanita setiap 3 bulan selama 1 tahun		mg
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 dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak bengkuang diberikan dalam dosis 70 mg/200 g BB, 140 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.	Ordinal	mg/g BB
Jumlah sel stroma	Jumlah sel stroma endometrium dinilai menggunakan histopatologi (<i>Hematoxylin</i> dan <i>Eosin/HE</i>) yang diperoleh melalui blok paraffin dengan prosedur standar dari lapisan endometrium uterus tikus. Sel stroma endometrium memiliki nukleus berbentuk oval, kumparan, dan sitoplasma yang sangat sedikit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan <i>microscope dot slide Olympus</i> dengan pembesaran 400x dengan 5 lapang pandang. Setiap sayatan dilakukan 4x pengamatan pada sisi atas, bawah, kiri dan kanan.	Rasio	Sel / lapang pandang
Ekspresi reseptor progesteron	Ekspresi sejumlah reseptor progesteron yang didapat dengan prosedur pemeriksaan <i>immunohistochemistry</i> (IHC) pada jaringan endometrium dan kemudian hasilnya dilihat menggunakan mikroskop cahaya <i>dot slide Olympus</i> pada pembesaran 400 kali dengan 5 lapang pandang. Jaringan dengan ekspresi PR akan berwarna kecoklatan. Penilaian secara semikuantitatif menggunakan <i>Proportion score</i> dengan melihat rata-rata persentasi sel yang terwarnai perlapang pandang. Perhitungan presentasi sel yang terekspresi menggunakan aplikasi FIJI.	Rasio	% / lapang pandang
Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) galur Wistar	Merupakan salah satu hewan coba yang perkembangbiakannya lebih cepat, ukuran tubuh lebih besar, dan bertahan cukup baik pada perlakuan. Dalam penelitian ini digunakan <i>Rattus norvegicus</i> galur <i>Wistar</i> yang sehat dengan umur 8-10 minggu dan berat 180-250 gram		
Hiopestrogen	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>). Hiopestrogen 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 tetap diberikan makan dan minum sesuai dengan standar. Tikus 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. Masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus sesuai dengan kelompok penelitian.

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. Pengapusan vagina dimulai dengan merendam *cotton bud* kedalam larutan *aquadest*. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan pada tikus dengan cara memasukkan *cotton bud* kedalam vagina kemudian diputar 360°. Setelah didapatkan lendir pada *cotton bud*, selanjutnya hasil apusan tersebut dioleskan pada *object glass* dan disemprot alkohol 70% dan dikeringkan. Setelah kering dilakukan pewarnaan *methelyn blue*, *object glass* kemudian dicuci dengan air mengalir setelah pengecatan selama 5-10 menit dan terakhir dilanjutkan dengan proses pengeringan. Kemudian hasilnya dilakukan pengamatan 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. Pada hari terakhir

perlakuan, diharapkan semua tikus berada pada fase proestrus sehingga setiap tikus berada pada fase yang sama dan dapat dibedah bersamaan.

4.7.2. Pembagian Kelompok Penelitian

Sebanyak 25 tikus 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 tidak dipapar DMPA dan tidak diberi ekstrak Bengkuang. Untuk mendapatkan *stressing gavage* yang sama diberi injeksi aqudest dengan jumlah yang sama dengan DMPA.
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. Setelah didapatkan kondisi hipoestrogen dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol 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. Setelah didapatkan kondisi hipoestrogen dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol 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. Setelah didapatkan kondisi hipoestrogen dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol 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 25 x 35 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 susu PAP dengan komposisi air (12%), protein kasar 16%, lemak kasar 3-7% serat kasar 8%, abu 10% kalsium 0,9-1,2%, phosphor 0,6-1,0% (PT. Japfa Comfeed Indonesia Tbk, 2013) dengan porsi 40 g/hari/ekor secara *ad libitum*. Tikus akan ditimbang sebelum pemberian DMPA dan setiap hari sebelum pemberian ekstrak Bengkuang untuk menentukan dosis yang sesuai.

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*.

2. Ekstraksi bengkuang dengan ethanol

Simplisia dari ekstrak bengkuang yang didapatkan selanjutnya diekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi dilaksanakan selama 3x24 jam dengan menggunakan konsentrasi pelarut etanol 96%.

Perbandingan yang digunakan untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang optimal antara simplisia dan pelarut sebanyak 1:10. Hasil ekstraksi yang masih kental dari proses maserasi selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C dengan kecepatan 50rpm. Kemudian didapatkan ekstrak kental murni yang tidak mengandung etanol dan dapat digunakan sebagai terapi.

4.7.5. Injeksi DMPA

Tikus ditimbang berat badannya terlebih dahulu menggunakan timbangan Sonic. DMPA dengan dosis 150 mg (3 ml) diencerkan dengan *aquabidest* sebanyak 7 ml dan diaduk agar homogen. Dosis DMPA yang diberikan pada tikus berdasarkan perhitungan menggunakan konversi berat badan tikus dan manusia.

Sesuai dengan tabel konversi berat badan manusia 70 kg, untuk *rat* (tikus) 200 gram adalah 0,018, sehingga untuk dosis yang diberikan pada tikus adalah $150\text{mg} \times 0,018 = 2,7 \text{ mg}$. Kemudian untuk menentukan berapa mL yang disuntikan dengan pengenceran 7 ml aquades dan 3 ml DMPA adalah $(2,7/150) \times 10\text{mL} = 0,18 \text{ mL}$.

Pemberian suntikan DMPA diambil 0,18 mL (2,7 mg) untuk diinjeksikan secara intramuskuler di *quadriceps* pada kelompok kontrol positif (KP) dan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) (Laurence, 2008; Veri, 2015).

Injeksi DMPA dilakukan setiap 3 hari 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 sebanyak 4 kali penyuntikan secara IM. Pemberian ulang dosis DMPA diperlukan jika belum didapatkan kondisi hipoestrogen setelah pemberian dosis 4 kali setiap 3 hari.

4.7.6. Menentukan Kondisi Hipoestrogen

Untuk pemeriksaan kondisi reproduksi dapat dilakukan dengan pemeriksaan apusan atau ulas vagina. Fungsi ovarium dapat diketahui dengan melihat diferensiasi atau perubahan pada sel epitel vagina ketika fase estrus, hal ini secara tidak langsung dapat menggambarkan adanya perubahan fungsional pada sistem reproduksi termasuk ovarium dan uterus. Pemeriksaan apusan vagina dilakukan setelah pemberian suntikan DMPA dosis terakhir. Pengapusan vagina dimulai dengan merendam *cotton bud* kedalam larutan *aquadest*. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan pada tikus dengan cara memasukan *cotton bud* kedalam vagina kemudian diputar 360°. Setelah didapatkan lendir pada *cotton bud*, selanjutnya hasil apusan tersebut dioleskan pada *object glass* dan disemprot alkohol 70% dan dikeringkan. Setelah kering dilakukan pewarnaan *methelyn blue*, *object glass* kemudian dicuci dengan air mengalir setelah pengecatan selama 5-10 menit dan terakhir dilanjutkan dengan proses pengeringan. Kemudian hasilnya dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Hasil pengamatan hipoestrogen disesuaikan dengan kondisi normal epitel vagina saat siklus estrus tanpa hipoestrogen dengan kondisi saat hipoestrogen.

Perbandingan yang digunakan dari hasil penilaian apusan pada kondisi hipoestrogen adalah ditemukannya sel leukosit pada vagina, tidak adanya sel yang terkornifikasi dan adanya atrofi pada sel epitel vagina (Parhizkar, *et al.* 2011).

4.7.7. Pemberian Ekstrak Bengkuang

Pemberian ekstrak bengkuang pada berbagai dosis, yaitu dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg/200 g BB, dan 280 mg/200 g BB setiap hari 1 kali selama 14 hari dengan pemberian secara sonde (Tunikasari, 2015). Pemberian ekstrak bengkuang selama 14 hari karena pada manusia DMPA membutuhkan waktu 4 sampai 6 bulan untuk secara bertahap menurun pada sirkulasi dan menghilang dalam kurun waktu 7 sampai 9 bulan (Strauss dan Barbieri, 2013).

4.7.8. Prosedur Pengambilan Sampel

Pembedahan dilakukan setelah perlakuan pemberian terapi selesai dan didapatkan kondisi proestrus melalui pemeriksaan apusan vagina dengan langkah berikut:

1. Menyiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, kloroform, formalin 10%, dan botol tertutup untuk hewan coba.
2. Tikus dikorbakan dengan cara dianastesi 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 ditempatkan pada alas papan dengan menggunakan paku payung yang ditancapkan pada keempat telapak kaki tikus dengan perut menghadap keatas.
4. Dinding toraks dibuka dengan menggunakan pinset dan gunting, kemudian darah diambil secara intrakardial melalui ventrikel kanan jantung, darah yang diambil sebanyak kurang lebih 2-3 ml melalui spuit kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa diberi antikoagulan lalu ditutup dengan sumbat karet.
5. Selanjutnya membuka dinding perut dengan menggunakan pinset dan gunting, kemudian membuka diafragma.

6. Ovarium dan jaringan endometrium diambil dan dimasukkan ke dalam tabung untuk selanjutnya dilakukan pembuatan diblok parafin dan dilakukan pemeriksaan IHC untuk melihat ekspresi PR dan histopatologi (HE) untuk menilai jumlah stroma endometrium.

4.7.9. Pemeriksaan Jumlah Sel Stroma Endometrium

Pemeriksaan histologi dimulai persiapan organ dimana tikus diekskusi pada fase proestrus dan mengambil organ uterus dan dimasukkan kedalam larutan fiksasi *buffer formalin* 10%. Organ/jaringan yang telah difiksasi selanjutnya dilakukan proses pemotongan secara transversa dengan ketebalan 2-3 mm pada bagian korpus kemudian dimasukkan ke kaset. Pemberian kode pada kaset dengan kode gross peneliti diperlukan sehingga mempermudah untuk identifikasi sampel. Kemudian masukkan kembali kedalam larutan formalin 10% sebelum diproses/dimasukkan ke alat *Tissue Tex Prosesor* dan diproses selama 90 menit. Proses selanjutnya dilakukan pengeblokan dan pemotongan jaringan dengan parafin sesuai dengan kode yang telah dibuat. Proses selanjutnya adalah pemotongan jaringan menggunakan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron. Pembuatan deparafinisasi dilakukan dengan memasukkan potongan jaringan kedalam oven selama 30 menit pada suhu 70-80°C, kemudian dimasukkan kedalam 2 tabung larutan xylol selama 20 menit. Proses selanjutnya dilakukan hidrasi dengan merendam jaringan kedalam 4 tabung alkohol, pada setiap tabung direndam selama 3 menit dan terakhir dimasukkan kedalam air selama 15 menit.

Tahap berikutnya adalah pengecatan dengan Hematoxilin selama 10-15 menit dan dilanjutkan dengan cat pembanding Eosin 1% selama 10-15 menit.

Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi dengan merendam pada larutan alkohol 70%, 80%, 96%, dan alkohol absolut, pada setiap rendaman dilakukan selama 3 menit. Setelah dehidrasi, dilanjutkan dengan penjernihan kedalam

larutan Xylol selama 60 menit dan dilakukan *mounting* dengan entelan dan deckglass, kemudian biarkan kering dan siap untuk diamati. Pengamatan terhadap jumlah sel stroma endometrium dilakukan dengan mikrometer yang ditempelkan pada lensa okuler mikroskop *Dot slide* dengan pembesaran 400 kali. Pengamatan dilakukan pada kedua kelompok (kontrol dan perlakuan). Setiap slide sample uterus dilakukan pengamatan dengan 5 lapang pandang pada 4 kuadran (atas, bawah, kiri, dan kanan) masing-masing kuadran dan hasilnya dijumlahkan dan dirata-rata.

4.7.10. Prosedur IHC untuk ekspresi reseptor progesteron.

Pengukuran ekspresi reseptor progesteron dilakukan dengan menggunakan tehnik IHC, dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Fiksasi dan pencucian jaringan uterus

Segera setelah mencit percobaan diterminasi, kemudian dilakukan seleksi untuk mengambil jaringan endometriumnya dan dimasukkan kedalam formalin 10% minimal selama 24 jam. uterus kemudian dipotong dengan ketebalan 0,5 cm.

2. Dehidrasi dan *clearing*

Jaringan endometrium dicuci dengan air mengalir, kemudian dimasukkan kedalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolute I, II, III, Xylol I dan II masing-masing 30 menit.

3. Infiltrasi dan pembuatan blok parafin

Proses infiltrasi serta pembuatan blok parafin dilakukan menggunakan alat *Automatic Tissue Embedding Apparatus Tissue-Tek*®

4. Pengirisan tipis

Pengirisan ini menggunakan mikrotom dan dilakukan secara *random* pada tiap pemotongan seri sebanyak 10 kali hanya dipilih satu dengan ketebalan 5-

7 µm untuk dicelupkan kedalam air hangat pada suhu 20°C-30°C hingga jaringan dapat mengembang dengan baik. Kemudian hasil pemotongan yang telah direndam diletakkan pada *object glass* yang telah diolesi dengan poly L-Lysine. Selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan menggunakan *hot plate*.

5. Deparafinisasi

Tujuan dari deparafinisasi adalah untuk mengkondisikan jaringan dari kondisi ada parafinnya ke kondisi air. Karena pada saat kita melakukan pengecatan kondisinya adalah air. Preparat uterus pada objek glass direndam dalam Xylo I, II, III masing-masing selama 3 menit. Setelah itu direndam kedalam alkohol absolut I dan II masing-masing 3 menit. Preparat yang telah direndam di dalam alkohol absolut kemudian dimasukkan ke dalam larutan alkohol 96%, 90%, 80%, 70% masing-masing 3 menit. Setelah itu dibilas dengan menggunakan air mengalir selama 5 menit.

6. Deteksi reseptor progesteron

Deteksi terhadap *progesterone receptor* dilakukan dengan pewarnaan menggunakan metode *immunohistochemistry* untuk memudahkan melihat adanya perubahan ekspresi pada jaringan. Deteksi PR dilakukan dengan pemberian *antibody monoclonal PR (AB-52) catalog SC-810*.

7. Counterstain

Preparat yang telah dilakukan *staining*, kemudian dilakukan *counterstain* dengan menggunakan pewarnaan mayer selama 3-10 menit. Setelah itu dicuci dengan menggunakan air mengalir selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dengan amoniak air selama 3 menit. Setelah itu dilakukan perendaman ke dalam aquadest selama 3-5 menit.

8. Mounting

Hasil preparat uterus pada *object glass* yang telah terwarnai selajutnya ditetesi

entelan cover dan ditutup dengan menggunakan cover glass

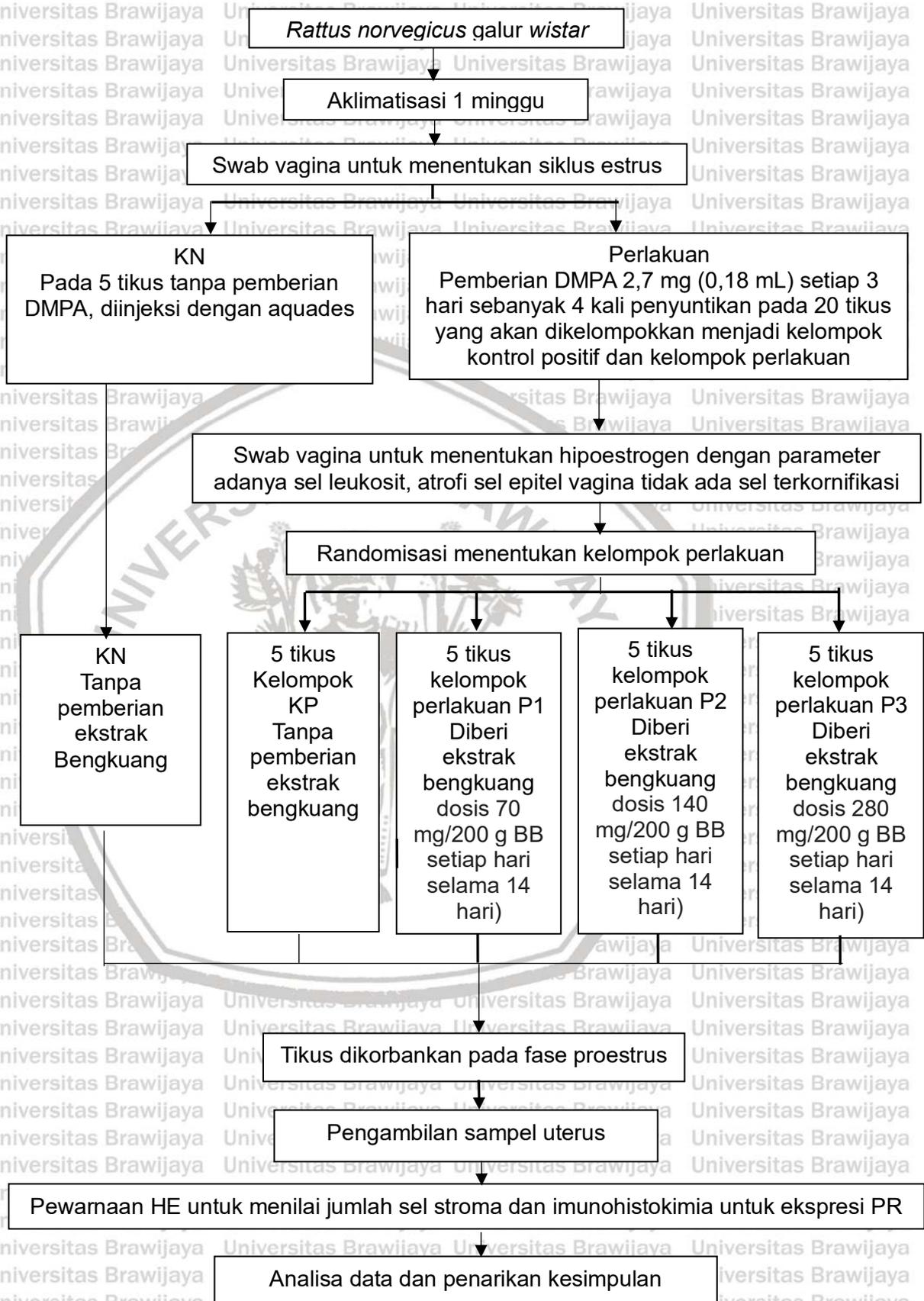
9. Pemeriksaan dengan mikroskop

Pemeriksaan ekspresi PR dilakukan dengan menggunakan Mikroskop cahaya *dotslide Olympus SC10* yang telah dilengkapi dengan digital kamera *Optilab +12 Megapixel* dan *software* pengolahan gambar *Optilab Viewer*. Data setiap sampel diamati dengan menghitung presentasi sel positif pada setiap lapang pandang dengan menggunakan aplikasi FIJI. Ekspresi PR dikatakan positif apabila terdapat perubahan warna kecoklatan pada sel target yang dituju yaitu pada stroma, epitel dan kelenjar. Pengamatan dilakukan pada 5 (lima) lapang pandang untuk masing-masing sampel dan kemudian hasil prosentase sel pada setiap lapang pandang dijumlahkan dan dirata-rata.

4.7.10 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 meter untuk menghindari pencemaran lingkungan (Bancroft, 2008).

4.8. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.9. Analisis Data

Analisis data dimulai dengan melakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pengujian ini digunakan untuk melihat normalitas data sebagai prasyarat menggunakan uji parametrik atau non-parametrik. Kriteria untuk uji normalitas jika $p\text{ value} > 0,05$ maka data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui pengaruh variabel dan membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok sampel kontrol negatif, kontrol positif dengan kelompok perlakuan. Jika pada uji *One Way Anova* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda dengan menggunakan uji *Duncan*. Tujuan digunakan uji *Duncan* adalah untuk menemukan homogenitas dari masing-masing kelompok perlakuan sehingga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna atau signifikan.

Uji hipotesis untuk mengetahui *cause-effect relationship* antara variabel *independent* terhadap variabel *dependent* yaitu pengaruh dosis ekstrak etanol Bengkuang terhadap jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi *progesterone receptor* dilakukan dengan uji korelasi *Spearman*. Uji ini dipilih berdasarkan prasyarat uji *non-parametric* karena variabel dosis ekstrak etanol memiliki skala data ordinal. Semua perhitungan dilakukan dengan bantuan *software SPSS for Windows 21*.

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Penelitian ini dilakukan di Institut Biosains Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan hewan coba, untuk pemeriksaan histopatologi jumlah sel stroma dan imunohistokimia ekspresi reseptor progesteron di Laboratorium Patologi Anatomi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan UPT Materia Medica Kota Batu untuk pembuatan ekstrak bengkuang. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari–Juni

2019. Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan menggunakan sampel penelitian sebanyak 25 ekor tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Tikus kemudian diinjeksi dengan DMPA (*Depot Medroxy Progesterone Acetate*) sehingga didapatkan efek samping berupa kondisi hipoestrogen yang ditentukan melalui pemeriksaan apusan vagina.

Sampel penelitian dibagi menjadi 5 kelompok pada setiap kelompok terdiri dari 5 tikus, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1) dengan pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 70 mg/200 g BB, kelompok perlakuan 2 (P2) dengan pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 140 mg/200 g BB, dan kelompok perlakuan 3 (P3) dengan pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB.

5.1. Hasil Pengamatan**5.1.1. Hasil Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)**

Ekstrak bengkuang yang digunakan pada penelitian ini didapatkan melalui proses pengeringan dari 6 kg Bengkuang segar yang didapatkan dari kecamatan Kayen Kidul Kabupaten Kediri Jawa Timur. Bengkuang yang telah dibersihkan kemudian diiris tipis dan dilakukan pengeringan menggunakan oven khusus hingga kadar air maksimal 10%. Kemudian

bengkuang yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk simplisia sebanyak 600 gram. Proses selanjutnya dilakukan ekstraksi dari 300 g simplisia dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dilanjutkan dengan proses evaporasi etanol untuk mendapatkan ekstrak kental murni dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C sehingga didapatkan ekstrak cair kental sebanyak 34 mL. Untuk menghitung kebutuhan ekstrak pada setiap kelompok penelitian dilakukan perhitungan sesuai dengan berat badan tikus (Lampiran 9). Pada penelitian ini dosis ekstrak bengkuang yang diberikan menjadi 3 kelompok dosis yaitu dosis 70 mg/200gBB, dosis 140 mg/200gBB, dan dosis 280 mg/200gBB. Ekstrak bengkuang diberikan pada tikus peronde setiap hari selama 14 hari.

5.1.2. Gambaran Apusan Vagina Tikus

Pemeriksaan apusan vagina pada tikus dilakukan sebelum pemberian DMPA, setelah pemberian DMPA dan sebelum pembedahan tikus. Apusan vagina pertama dilakukan untuk menentukan fase estrus pada tikus sebelum dimulai pemberian paparan DMPA yang ditandai dengan adanya sel yang terkornifikasi.

Pemeriksaan apusan vagina ke-2 dilakukan setelah pemberian injeksi DMPA dengan dosis 2,7 mg (0,18ml) secara intramuskuler pada otot *quadriceps* dilakukan setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali pada kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3). Pemeriksaan ini bertujuan untuk menentukan kondisi hipoestrogen pada tikus yang merupakan pengaruh dari pemberian DMPA pada tikus. Setelah didapatkan kondisi hipoestrogen melalui apusan vagina dilanjutkan dengan pemberian terapi ekstrak etanol

bengkuang pada kelompok P1 dengan dosis 70 mg/200 g BB, kelompok P2 dengan dosis 140 mg/200 g BB, dan kelompok P3 dengan dosis 280 mg/200 g BB. Pemberian ekstrak bengkuang diberikan menggunakan sonde 1 kali setiap hari selama 14 hari.

Pemeriksaan apusan vagina ke-3 dilakukan untuk menentukan fase proestrus pada tikus setelah pemberian terapi ekstrak etanol Bengkuang dengan berbagai dosis sebelum dilakukan pembedahan. Hasil pemeriksaan apusan vagina pada tikus dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil Pemeriksaan Apusan Vagina Pada Tikus

Keterangan : Gambaran apusan vagina pada tikus dengan pewarnaan *methelyn blue* sebelum dipapar DMPA pada fase estrus tanda panah merah menunjukkan adanya kelompok sel epitel skuamosa yang *cornified*, tidak ada nukleus yang terlihat dan bentuknya tidak beraturan (A). Gambaran apusan vagina pada tikus dengan pewarnaan *gentian violet* setelah dipapar DMPA, tanda panah merah menunjukkan gambaran leukosit dan tidak ditemukan adanya sel kornifikasi (B). Gambaran apusan vagina dengan pewarnaan *gentian violet* pada fase proestrus sebelum dilakukan pembedahan, tanda panah merah menunjukkan adanya sel epitel berinti (C). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 200x.

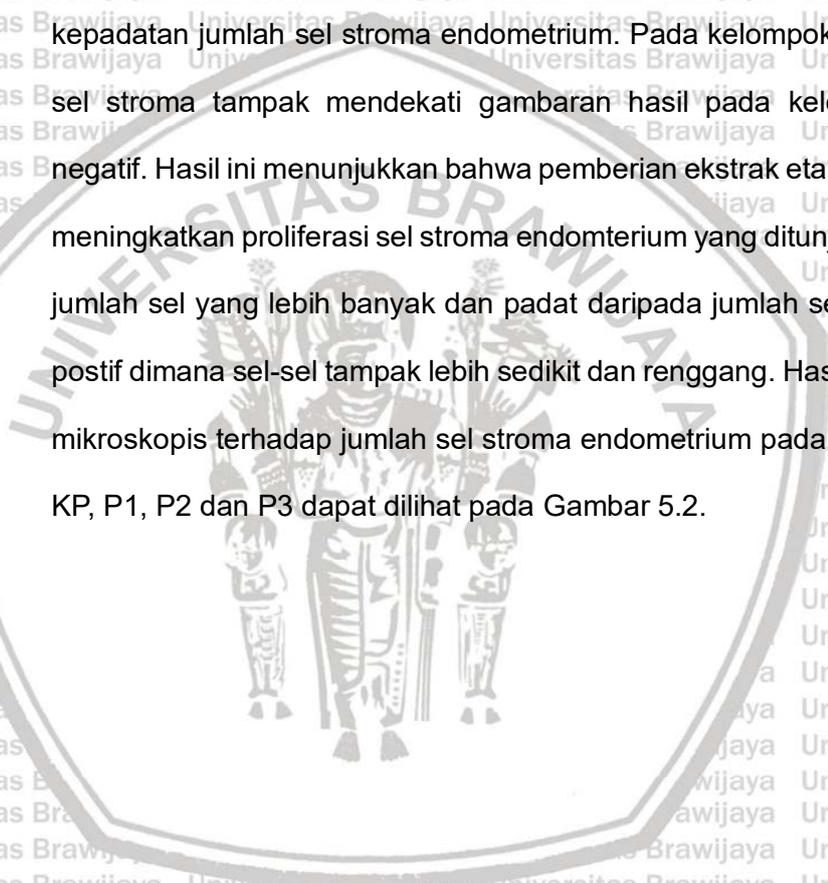
5.1.3. Gambaran Histologi Sel Stroma Endometrium

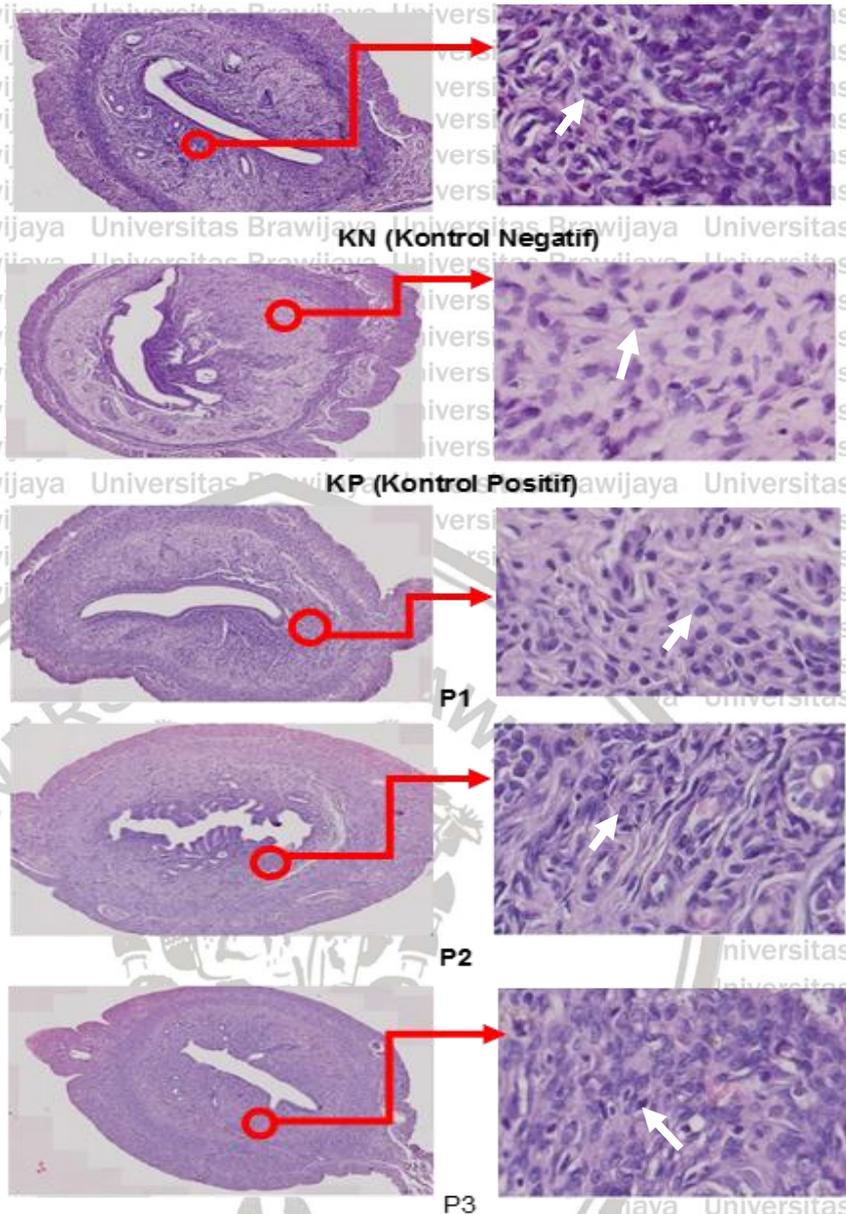
Pemeriksaan histologi sel stroma endometrium dilakukan untuk menentukan jumlah sel stroma endometrium pada tikus setelah dilakukan pembedahan. Untuk membuat preparat histopatologi uterus dilakukan dengan pengecatan Hematoxilin dan Eosin 1%. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *dot slide Olympus* dengan pembesaran 400x. Setiap slide sampel uterus dilakukan pengamatan sebanyak 5 lapang pandang kemudian hasilnya dijumlahkan dan dirata-rata.

Gambaran mikroskopis pada sel stroma endometrium pada setiap

kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang bervariasi sesuai dengan perlakuan yang diberikan. DMPA dapat mempengaruhi jumlah sel stroma endometrium pada kelompok kontrol positif dengan diberikan DMPA tampak stroma yang lebih jarang dan sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Sedangkan dengan pemberian ekstrak etanol Bengkulu (*Pachyrizus erosus*) berbagai dosis menunjukkan adanya perubahan kepadatan jumlah sel stroma endometrium. Pada kelompok perlakuan P3 sel stroma tampak mendekati gambaran hasil pada kelompok kontrol negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkulu meningkatkan proliferasi sel stroma endometrium yang ditunjukkan dengan jumlah sel yang lebih banyak dan padat daripada jumlah sel pada kontrol positif dimana sel-sel tampak lebih sedikit dan renggang. Hasil pengamatan mikroskopis terhadap jumlah sel stroma endometrium pada kelompok KN, KP, P1, P2 dan P3 dapat dilihat pada Gambar 5.2.





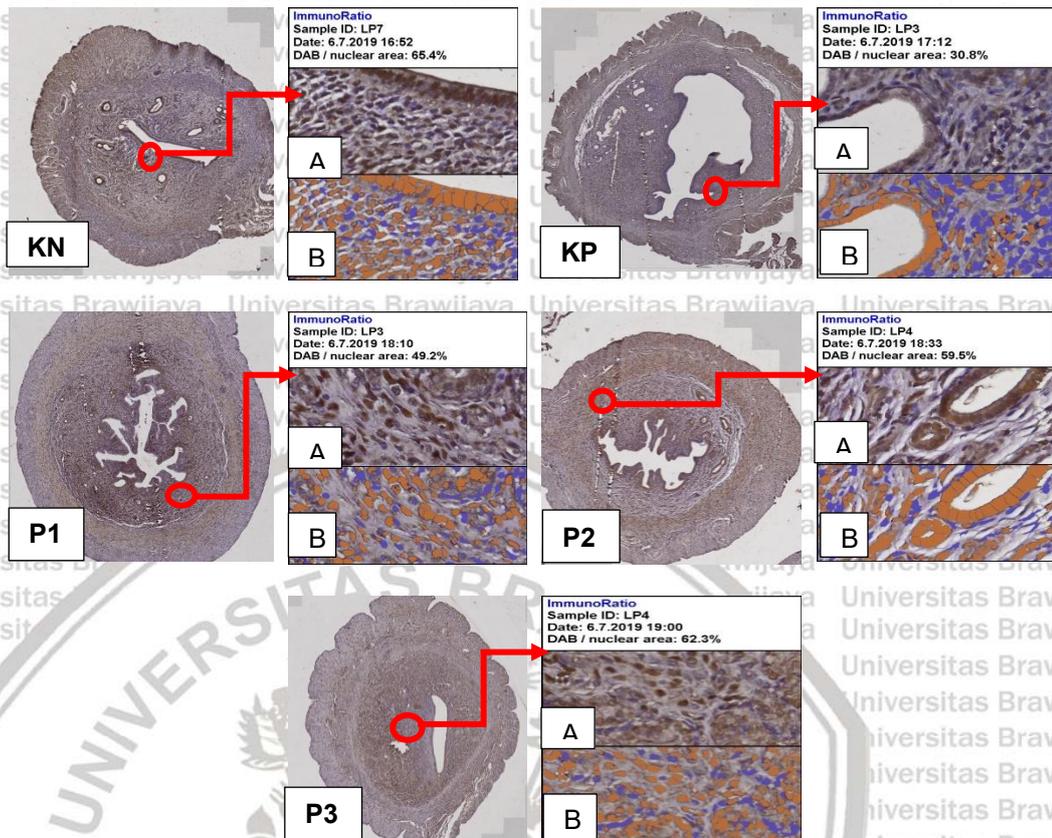
Gambar 5.2 Pengamatan sel stroma endometrium pada tikus dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) pada irisan endometrium menggunakan *microscope dot slide Olympus SC10* dengan pembesaran 400 kali

Keterangan : Pada gambar diatas tanda panah merah menunjukkan salah satu contoh lapang pandang pada pengamatan secara mikroskopis pembesaran 400x. Panah warna putih menunjukkan contoh bentuk sel stroma yang terwarnai biru gelap pada nukleusnya. Hasil gambaran terlihat bahwa pada kelompok kontrol positif (KP) jumlah sel stroma lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN). Sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 menunjukkan adanya perubahan jumlah sel stroma endometrium setelah pemberian ekstrak etanol bengkung dengan 3 dosis yang berbeda. Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak etanol bengkung dosis 280 mg/200 g BB setelah pemberian DMPA didapatkan jumlah sel stroma yang lebih banyak dibandingkan kelompok perlakuan P1 dengan ekstrak etanol bengkung dosis 70 mg/200 g BB dan P2 dengan ekstrak bengkung dosis 140 mg/200 g BB.

5.1.4. Gambaran Ekspresi Reseptor Progesteron pada Pemeriksaan Imunohistokimia

Pengamatan terhadap ekspresi reseptor progesteron menggunakan pemeriksaan imunohistokimia, dan hasilnya diamati menggunakan *dot slide Microscope Olympus* dengan pembesaran 400 kali pada 5 lapang pandang pada 4 kuadran (atas, bawah, kanan, dan kiri) dan untuk menghitung *immunoratio* menggunakan aplikasi FIJI.

Gambaran dari ekspresi reseptor progesteron pada satu lapang pandang yang dilakukan perhitungan terhadap presentase sel positif mengekspresikan reseptor progesteron dengan aplikasi FIJI dinilai dengan perbandingan rasio warna sel yang positif dengan sel yang negatif. Berdasarkan dari gambaran hasil imunohistokimia ekspresi reseptor progesteron menunjukkan bahwa presentase ekspresi pada kelompok KP lebih sedikit daripada kelompok KN. Pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 terlihat adanya peningkatan ekspresi yang dilihat dari semakin tampak warna kecoklatan yang menggambarkan sel yang positif mengekspresikan reseptor progesteron. Ekspresi ditunjukkan dengan perubahan warna kecoklatan melalui pewarnaan DAB. Pada kelompok P3 dengan pemberian ekstrak etanol bengkuang dosis 280 mg/200 g BB/hari menunjukkan adanya peningkatan presentasi sel yang terekspresi pada pada stroma, maupun epitel dan kelenjar. Gambaran ekspresi reseptor progesteron pada hasil pemeriksaan imunohistokimia terdapat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Pengamatan immunohistokimia ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus menggunakan *microscope dot slide Olympus SC10* dengan pembesaran 400 kali

Keterangan : Pada gambaran immunohistokimia warna coklat menunjukkan ekspresi reseptor pada sel target dengan pewarnaan DAB. Tanda panah merah merupakan salah satu contoh lapang pandang secara mikroskopis dengan pembesaran 400 kali. Gambar A pada masing-masing kelompok merupakan salah satu lapang pandang sebelum diamati dengan aplikasi FIJI, Gambar B pada masing-masing kelompok merupakan lapang pandang yang sama setelah diamati dengan aplikasi FIJI dengan keterangan warna oranye menunjukkan sel yang terwarnai DAB sehingga positif mengekspresikan PR dan warna biru merupakan sel yang tidak mengekspresikan PR. Hasil pengamatan pada kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan bahwa presentase ekspresi reseptor progesteron lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN). Sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 menunjukkan hasil adanya peningkatan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium setelah pemberian ekstrak etanol bengkung dengan 3 dosis yang berbeda. Kelompok P3 dengan pemberian ekstrak etanol Bengkuang dosis 280 mg/200 g BB setelah pemberian DMPA didapatkan ekspresi reseptor progesteron yang lebih banyak baik di stroma maupun pada epitel kelenjar endometrium dibandingkan kelompok perlakuan P1 dengan ekstrak etanol bengkung dosis 70 mg/200 g BB dan P2 dengan ekstrak Bengkuang dosis 140 mg/200 g BB.

5.2. Hasil Analisis Data

5.2.1. Uji Normalitas Data

Penelitian ini terdiri dari dua parameter yaitu jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron dengan skala data rasio, sehingga untuk uji normalitas data dapat dilakukan dengan pendekatan statistik parametrik yaitu dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas data dilakukan sebelum membuktikan hipotesis dan untuk menentukan apakah pada kedua parameter terdistribusi normal atau tidak. Data disebut berdistribusi normal jika nilai $p >$ nilai α (0,05). Hasil analisis uji normalitas data dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil uji normalitas data

Kelompok pengamatan	p-value		Distribusi
	Jumlah Sel Stroma Endometrium	Ekpresi Reseptor Progesteron	
Kontrol Negatif	0,664	0,127	Normal
Kontrol Positif (DMPA)	0,156	0,200	
P1 (Eks. Bengkg 70mg/200g BB)	0,180	0,200	
P2 (Eks. Bengkg 140mg/200g BB)	0,747	0,086	
P3 (Eks. Bengkg 280mg/200g BB)	0,888	0,141	

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 bahwa data jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron memperoleh bahwa nilai $p\text{-value}$ lebih dari α (0,05). Berdasarkan hasil tersebut didapatkan bahwa pada semua kelompok penelitian memiliki data yang terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian.

5.2.2. Hasil uji One Way Anova

Uji komparasi dilakukan untuk membandingkan pengaruh ekstrak etanol benkuang terhadap tikus yang diberi injeksi DMPA (KP, P1, P2, dan P3) dengan kontrol negatif (KN) yang tidak diberi paparan apapun. Uji komparasi menggunakan *One-Way Anova* dengan hasil ada perbedaan bermakna jika nilai $p\text{-value} <$ α

(0,005). Setelah dilakukan uji komparasi dilanjutkan dengan uji *Multiple Comparisons* dengan *Duncan*.

Berdasarkan uji *One-Way Anova* didapatkan bahwa *p-value* = 0.000, hal ini membuktikan bahwa ada perbedaan bermakna pada rerata jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron pada masing-masing kelompok.

Setelah didapatkan adanya perbedaan yang signifikan maka selanjutnya dilakukan uji *Duncan*. Berdasarkan hasil uji *Duncan* didapatkan tingkat homogenitas antara masing-masing kelompok penelitian yang disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil uji *Duncan* pada jumlah stroma dan ekspresi reseptor progesteron

Kelompok Penelitian	Rerata	
	Jumlah Sel Stroma Endometrium	Ekspresi Reseptor Progesteron
Kontrol Negatif	175,60 ^b	68,1260 ^e
Kontrol Positif (DMPA)	105,40 ^a	43,9880 ^a
P1 (Eks. Bengkuang 70mg/200g BB)	121,60 ^a	50,9360 ^{ab}
P2 (Eks. Bengkuang 140mg/200g BB)	131,00 ^a	56,4880 ^b
P3 (Eks. Bengkuang 280mg/200g BB)	165,00 ^b	66,9800 ^c

Keterangan : Pada rerata jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (*p-value*<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan bermakna (*p-value*>0,05).

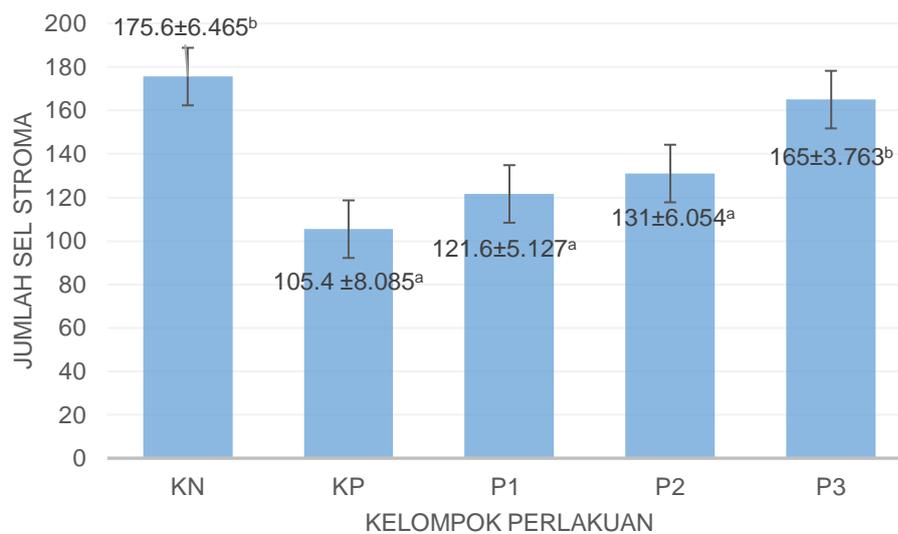
Berdasarkan huruf keterangan pada Tabel 5.2 jumlah sel stroma endometrium, antara kelompok KN dengan kelompok KP memiliki huruf yang berbeda sehingga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna. Sedangkan huruf yang sama pada rerata KN (175,60^a) dan P3 (165,00^a) menunjukkan tingkat homogenitas yang sama sehingga rerata pada kedua kelompok ini tidak berbeda bermakna. Pada kelompok P3 dosis ekstrak etanol bengkuang yang diberikan sebanyak 280 mg/200 gBB/hari terbukti dapat meningkatkan jumlah sel stroma endometrium mendekati kondisi normal.

Sedangkan rerata pada kelompok KP (105,40^b) dengan P1 (121,60^b) dan P2 (131,00^b) memiliki tingkat homogenitas rerata yang sama melalui uji *Duncan*

yang ditunjukkan dengan huruf b yang sama. Hasil ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang dengan dosis ekstrak 70 mg/200 g BB/hari dan dosis ekstrak 140 mg/200 g BB/hari mampu meningkatkan jumlah sel stroma endometrium tetapi belum mampu mendekati kondisi normal pada kelompok kontrol negatif yang tidak diberikan paparan dan terapi apapun. Jadi hipotesis kedua terbukti, yaitu pemberian ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg/200 g BB, dan 280mg/200 g BB mampu meningkatkan jumlah sel stroma endometrium pada tikus wistar model hipoestrogen dengan DMPA.

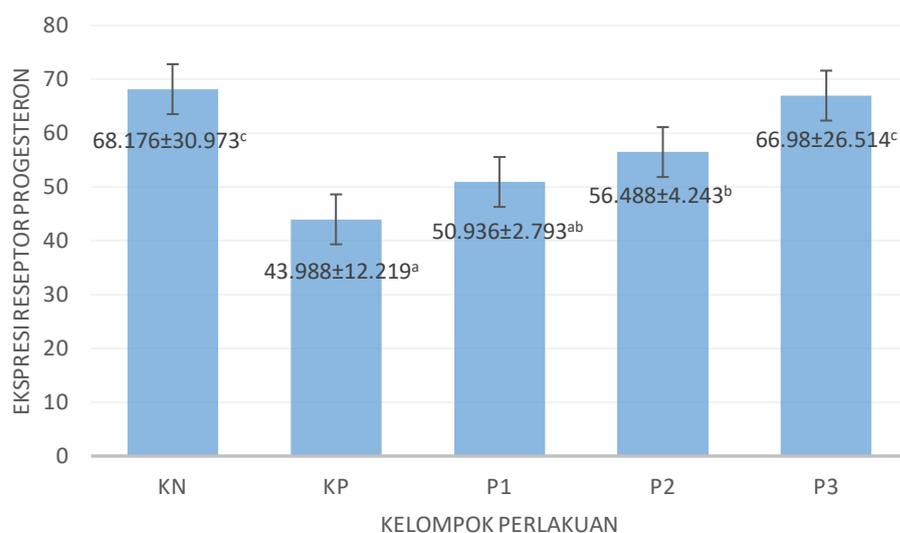
Hasil ekspresi reseptor progesteron pada Tabel 5.2 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang pada kelompok perlakuan P1 (dosis 70mg/200gBB/hari), P2 (dosis 140mg/200gBB/hari) dan P3 (dosis 280mg/200gBB/hari) berpengaruh bermakna terhadap peningkatan ekspresi reseptor progesteron. Pada kelompok KP (43,9880^a) berbeda bermakna dengan kelompok KN (68,1260^c), kelompok P2 (56,4880^b), dan kelompok P3 (66,9800^c), namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok P1 (50,9360^{ab}). Sedangkan pada kelompok P3 menunjukkan tingkat homogenitas rerata yang sama (66,9800^c) dengan kelompok kontrol negatif (68,1260^c). Sehingga berdasarkan hasil tersebut, hipotesis ketiga terbukti, yaitu pemberian ekstrak etanol bengkuang dengan dosis 70 mg/200 g BB, 140 mg/200 g BB, dan 280mg/200 g BB mampu meningkatkan ekspresi reseptor progesteron pada tikus wistar model hipoestrogen dengan DMPA.

Selanjutnya rerata jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron pada kelompok penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.4 dan Gambar 5.5 di bawah ini.



Gambar 5.4 Histogram rerata jumlah sel stroma endometrium

Berdasarkan gambar 5.4 histogram rerata jumlah sel stroma endometrium menunjukkan bahwa rerata tertinggi adalah pada kelompok kontrol negatif ($175,6 \pm 6,465^b$) sedangkan rerata terendah terdapat pada kelompok kontrol positif ($105,4 \pm 8,085^a$) yang diberi injeksi DMPA tanpa diberikan terapi ekstrak etanol benkuang. Pada kelompok perlakuan yang diberikan terapi ekstrak etanol benkuang P1 (dosis 70 mg/200gBB/hari), P2 (dosis 140 mg/200gBB/hari), dan P3 (dosis 280 mg/200gBB/hari) menunjukkan adanya peningkatan rerata jumlah sel stroma seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol benkuang dibandingkan dengan kontrol positif. Sehingga hal ini membuktikan bahwa ekstrak etanol benkuang dapat meningkatkan jumlah sel stroma endometrium tikus yang diberi injeksi DMPA. Sedangkan dosis yang dapat meningkatkan jumlah sel stroma lebih baik mendekati kontrol negatif adalah pada kelompok perlakuan P3 ($165,00 \pm 3.763^b$) dengan dosis ekstrak 280 mg/200gBB/hari.



Gambar 5.5 Histogram rerata ekspresi reseptor progesteron

Berdasarkan Gambar 5.5 menunjukkan histogram rerata ekspresi reseptor progesteron pada masing-masing kelompok penelitian. Pada gambar tersebut tampak rerata tertinggi adalah pada kelompok KN ($68,176 \pm 30,973^c$) dan rerata terendah pada kelompok KP ($43,968 \pm 12,219^a$) yaitu tikus yang diberi injeksi DMPA tanpa diberikan terapi ekstrak etanol bengkung. Sedangkan pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 dengan terapi ekstrak etanol Bengkuang menunjukkan adanya peningkatan rerata ekspresi reseptor progesteron seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang diberikan. Rerata pada kelompok perlakuan P3 dengan dosis ekstrak etanol bengkung 280 mg/200gBB/hari memiliki rerata yang tidak berbeda bermakna dengan rerata kelompok kontrol negatif (KN). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkung mampu meningkatkan ekspresi reseptor progesteron dan pada dosis 280 mg/200gBB/hari dianggap paling cepat dapat meningkatkan ekspresi reseptor progesteron dibandingkan dosis lainnya.

5.2.3. Hasil Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan pengaruh variabel independen yaitu dosis ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap variabel dependen yaitu jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron. Data pada dosis ekstrak etanol bengkuang menunjukkan skala data ordinal sehingga tidak memenuhi untuk uji parametrik, sehingga diperlukan uji non-parametrik dengan uji *Spearman rank*. Hasil uji korelasi dengan *Spearman* disajikan pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Uji Korelasi

Variabel yang Dihubungkan	Koefisien Korelasi	Sig. (2-tailed)
Dosis terhadap jumlah sel stroma	0,947	0,000
Dosis terhadap ekspresi reseptor progesteron	0,756	0,001

Keterangan : Nilai sig (2-tailed) atau nilai $p < \alpha$ menunjukkan ada hubungan yang signifikan antara variable.

Berdasarkan hasil pada Tabel 5.3 tingkat koefisien korelasi antara variabel dosis ekstrak etanol bengkuang terhadap jumlah sel stroma adalah 0,947 yang berarti korelasi atau hubungan yang sangat kuat dengan nilai positif. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan yang searah, dimana semakin meningkat dosis maka semakin meningkat jumlah sel stroma dan berlaku sebaliknya. Hubungan antara dosis terhadap jumlah sel stroma didapatkan nilai p sebesar $0,000 < \alpha$ sehingga terbukti signifikan ada korelasi antara dosis ekstrak etanol Bengkuang dengan jumlah sel stroma endometrium.

Hasil koefisien korelasi antara dosis ekstrak etanol bengkuang terhadap ekspresi *progesterone receptor* yang terdapat pada Tabel 5.3 juga membuktikan adanya korelasi atau hubungan yang kuat dan bersifat positif dengan nilai 0,756. Hasil tersebut menunjukkan adanya hubungan yang searah, dimana semakin meningkat dosis maka semakin meningkat ekspresi reseptor progesteron, dan berlaku sebaliknya. Hubungan antara dosis terhadap ekspresi reseptor

progesteron didapatkan nilai p sebesar $0,001 < \alpha$ sehingga terbukti signifikan ada korelasi antara dosis ekstrak etanol bengkuang dengan ekspresi reseptor progesteron. Berdasarkan hasil uji korelasi antara variabel dosis dengan variabel jumlah stroma dan ekspresi reseptor progesteron dapat membuktikan hipotesis penelitian kedua dan ketiga, yaitu pemberian ekstrak etanol bengkuang dapat meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada tikus wistar model hipoestrogen dengan DMPA.



BAB 6

PEMBAHASAN

DMPA (*Depot-Medroxy Progesterone Acetat*) merupakan jenis kontrasepsi hormonal yang banyak di gunakan diseluruh dunia termasuk Indonesia dengan cakupan pengguna tertinggi (Kemenkes, 2018). Hal ini karena DMPA termasuk dalam kontrasepsi yang memiliki efektivitas tinggi dan dapat digunakan oleh wanita dalam masa laktasi serta tidak dapat menggunakan kontrasepsi hormonal dengan estrogen (Jacobstein & Polis, 2014). DMPA mengandung hormon progesteron sintetik atau 6-*alfa*-medroksiprogesteron dengan efek progestogen yang kuat dan fektif sehinggann dapat digunakan sebagai pengobatan endometriosis, abortus dan sebagai kontrasepsi efektif yang diberikan secara injeksi intramuscular dengan dosis 150 mg setiap 3 bulan (*Family Planning Division Ministry of Health and Family Welfare Government of India*, 2016; Hartanto, 2004).

Disamping kelebihan yang dimiliki, DMPA memberikan efek negatif setelah pemberhentian injeksi yaitu kembalinya masa subur yang lebih lama. Hal ini berkaitan dengan masa aktif DMPA yang membutuhkan waktu 6 hingga 8 bulan untuk menghilang dalam tubuh bahkan lebih lama pada beberapa wanita (Haider & Darney, 2007). Hormon progesteron pada DMPA berdifusi secara bebas ke sel target dan berikatan dengan reseptor progesteron. Setelah terjadi ikatan dengan reseptor, progestein akan memperlambat pelepasan GnRH dari hipotalamus dan akan menekan lonjakan LH preovulatori, sehingga mencegah maturase folikel dan secara umum menghambat terjadinya ovulasi (Nelson, 2010). Secara normal, pelepasan GnRH dari hipotalamus merangsang hipofisis untuk mensintesis, menyimpan dan mengekspresikan LH dan FSH. FSH berperan terhadap pematangan folikel sedangkan LH berperan terhadap terjadinya ovulasi. Setelah

pelepasan kedua hormon tersebut selanjutnya merangsang gonad untuk mensintesis hormon seks steroid melalui mekanisme umpan balik negatif hormon gonadotropin di hipofisis anterior, sebaliknya DMPA mengakibatkan adanya perubahan terhadap sumbu HPO (hipotalamus, pituitary dan ovarium), sehingga berpengaruh terhadap umpan balik sintesis dan sekresi hormon seks steroid estrogen dan progesteron (Popat *et al.*, 2008). Selain itu, penghambatan terhadap perkembangan folikel mempengaruhi produksi estrogen yang dihasilkan oleh folikel. Rendahnya kadar estrogen ini dapat menghambat perkembangan endometrium dan mempengaruhi kondisi vagina pada siklus menstruasi (King *et al.*, 2013; Borekci *et al.*, 2009).

Pada penelitian ini pemeriksaan apusan vagina dilakukan untuk menentukan kondisi hipoestrogen setelah pemberian injeksi DMPA dengan dosis 2,7 mg (0,18 ml) yang diberikan setiap 3 hari sebanyak 4 kali pengulangan pada tikus. Gambaran hasil apusan vagina pada tikus hipoestrogen ditandai dengan tidak ditemukannya sel kornifikasi, melainkan ditemukannya sel leukosit dalam jumlah yang banyak seperti pada fase diestrus dan pada tikus hipoestrogen yang ovariectomi (Gambar 5.1). Pada siklus estrus normal, kondisi estrogen yang tinggi pada fase proestrus dan estrus mempengaruhi ketebalan sel epitel berinti pada vagina sehingga pada kondisi ini ditemukan adanya sel epitel berinti dan sel yang terkornifikasi, sedangkan pada fase diestrus tidak ditemukannya sel terkornifikasi tetapi ditemukan adanya sel leukosit dalam jumlah yang banyak (Zanni, *et al.* (2014). Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Pharuzkar, *et al.*, 2011) yang membandingkan hasil apusan vagina pada tikus ovariectomi yang ditandai dengan defisiensi estrogen didapatkan adanya sejumlah besar leukosit dibandingkan dengan hasil apusan vagina pada tikus ovariectomi yang diberikan *conjugate equine estrogen* (0,2 mg/kg) setelah 3 minggu ditemukan adanya sel-sel epitel terkornifikasi dan sedikit leukosit.

Pemberian paparan DMPA pada tikus yang terlalu lama ini mempengaruhi fisiologi endometrium, diantaranya terjadinya atrofi pada lapisan endometrium yang terdiri dari sel epitel, sel stroma dan juga terjadinya penurunan kepadatan pembuluh darah endometrium (Speroff & Darney, 2010; Dinh *et al.*, 2015). Pada penelitian ini DMPA mampu mempengaruhi sel stroma dan ekspresi reseptor hormon progesteron pada endometrium (Gambar 5.2 dan 5.3). Penelitian oleh Hickey dan Salamonsen (2008) membuktikan adanya perubahan molekuler dan struktural pada pembuluh darah serta sel-sel endometrium pada wanita setelah penggunaan DMPA jangka panjang. Perubahan ini dapat menjadi penyebab efek samping yang sering dialami oleh pengguna DMPA yaitu gangguan menstruasi.

Untuk memperbaiki efek samping negatif dari pemberian injeksi DMPA dapat dilakukan dengan memberikan fitoestrogen. Fitoestrogen termasuk dalam kelompok isoflavone yang merupakan senyawa turunan dari tumbuhan yang memiliki afinitas mengikat yang signifikan terhadap reseptor estrogen baik ER α maupun ER β meskipun lebih lemah daripada estradiol (Kim & Park, 2012). Bengkuang merupakan salah satu tanaman yang mengandung banyak isoflavon termasuk fitoestrogen. Penelitian oleh Primiani (2013) membuktikan bahwa ditemukan kandungan isoflavon berupa daidzein dan genestein yang cukup banyak dari ekstrak Bengkuang. Fitoestrogen dalam Bengkuang diharapkan dapat memperbaiki efek samping hipoestrogen setelah penggunaan DMPA. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol Bengkuang terhadap jumlah sel stroma endometrium dan ekspresi reseptor progesteron (PR) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipoestrogen dengan DMPA. Penelitian ini mengacu pada penelitian oleh Primiani (2015) yang membuktikan bahwa pemberian ekstrak Bengkuang dapat digunakan sebagai *Hormon Replacement Therapy* (HRT) dan memperbaiki fungsi reproduksi pada tikus model menopause yang diovariektomi.

6.1. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang Terhadap Jumlah Sel Stroma pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA

Hasil pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan *Haemotoxylin Eosin* (HE) pada penelitian ini membuktikan bahwa pemberian DMPA pada kelompok kontrol positif (KP) menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sel stroma yang signifikan setelah pemberian injeksi DMPA ke-4. Sel stroma yang diamati menggunakan *dot slide Microsoft Olympus XC10* dengan pembesaran 400 kali pada 5 lapang pandang ditunjukkan dengan bentuk sel yang memiliki nukleus berbentuk oval, kumparan dan sitoplasma yang sedikit. Hasil analisis data dengan uji *One Way Anova* terhadap jumlah sel stroma didapatkan bahwa ada perbedaan bermakna pada data kelompok kontrol negatif (KN) pada tikus yang tidak diberi injeksi DMPA dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (KP) yaitu tikus yang diberi injeksi DMPA dengan nilai $p = 0,000$ dengan nilai rerata KP yang lebih rendah daripada KN

Perubahan sel stroma endometrium disebabkan oleh kandungan hormon progesteron yang ada pada DMPA. Penelitian oleh Lessey (2003) yang juga membuktikan bahwa kandungan progesteron pada DMPA secara langsung juga mempengaruhi sel stroma endometrium dengan cara menghambat proliferasi sel stroma endometrium. Hal ini terjadi karena progesteron diketahui memiliki fungsi ganda yaitu merangsang faktor parakrin stroma serta menghambat reseptor estrogen dan progesteron. Penurunan terhadap jumlah stroma endometrium berhubungan dengan terjadinya atrofi pada dinding endometrium yang dapat menghambat terjadinya implantasi hasil fertilisasi dan perubahan pola perdarahan (Nelson, 2010; King *et al.*, 2013). Sehingga untuk meningkatkan jumlah sel stroma endometrium pada penelitian ini dilakukan dengan pemberian ekstrak etanol bengkuang.

Pada penelitian ini pemberian ekstrak etanol bengkuang diberikan pada

tikus setelah injeksi DMPA terakhir dan ditemukan adanya kondisi hipoestrogen melalui pemeriksaan apusan vagina. Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan terhadap gambaran pemeriksaan histopatologi sel stroma endometrium pada kelompok perlakuan (Gambar 5.2). Pemberian terapi ekstrak etanol bengkuang pada kelompok perlakuan memberikan gambaran sel stroma yang lebih padat dan meningkat jumlahnya daripada kelompok kontrol positif yang memiliki sel stroma lebih sedikit dan jarang. Hasil analisis data menggunakan uji *One Way Anova* juga membuktikan adanya perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Berdasarkan uji *Duncan* diperoleh hasil perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan, sehingga hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang dapat meningkatkan jumlah sel stroma endometrium pada tikus wistar model hipoestrogen yang diberi injeksi DMPA. Sedangkan untuk dosis yang dianggap paling efektif dan cepat dalam meningkatkan jumlah sel stroma adalah pada kelompok perlakuan 3 (P3) yaitu dosis ekstrak 280 mg/200gBB/hari dengan nilai rerata yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif.

Ekstrak bengkuang diketahui mengandung fitoestrogen berupa genestein dan daidzein yang dapat digunakan sebagai *Hormone Replacement Therapy* (HRT). Penelitian oleh Primiani (2011) membuktikan bahwa pemberian ekstrak bengkuang dapat meningkatkan proliferasi sel pada lapisan endometrium. Ekstrak bengkuang memiliki pengaruh yang positif terhadap penebalan dinding endometrium pada tikus yang mengalami hipoestrogen, karena fitoestrogen memiliki peran yang menyerupai estrogen endogen (Primiani, 2015; Prakash & Dubois, 2015). Pemberian fitoestrogen yang memiliki fungsi dan struktural yang mirip dengan estradiol dapat digunakan untuk memperbaiki kondisi endometrium yang menjadi atrofi setelah penggunaan DMPA. Menurut Tsutsumi (2010)

mengungkapkan bahwa estradiol (E2) secara signifikan meningkatkan produk yang merangsang proliferasi endometrium pada manusia sehingga mempengaruhi interaksi epitel dan stroma endometrium serta peyebarannya

6.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Bengkuang Terhadap Ekspresi Reseptor Progesteron pada Endometrium Tikus Wistar yang Diinjeksi DMPA

Pada hasil penelitian ini juga membuktikan adanya perubahan pada ekspresi progesteron reseptor pada tikus setelah pemberian injeksi DMPA terakhir.

Pegamatan terhadap ekspresi reseptor progesteron pada endometrium dilakukan dengan menggunakan *ImmunoRatio* melalui aplikasi FIJI. Aplikasi FIJI atau dikenal juga dengan *ImageJ* digunakan untuk dapat menghitung presentase ekspresi antibodi dengan perbandingan warna sel yang terekspresi terhadap seluruh sel dari pengamatan satu lapang pandang. Perhitungan *Immunoratio* pada aplikasi *ImageJ* dikembangkan untuk mempermudah dalam menganalisis secara kuantitatif terhadap *slide scoring* imunohistokimia (Tuominen, *et al.*, 2010).

Hasil pemeriksaan dengan menggunakan imunohistokimia pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar DMPA (KP) menunjukkan adanya penurunan ekspresi dari reseptor progesteron (PR) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) pada Gambar 5.3. Hasil analisis uji data menggunakan uji *One Way Anova* didapatkan hasil yang signifikan dengan nilai *p-value* 0,000 sehingga pemberian DMPA pada tikus berpengaruh terhadap ekspresi reseptor progesteron pada endometrium tikus. Selanjutnya berdasarkan hasil uji LSD didapatkan rerata presentase ekspresi *progesterone receptor* lebih rendah pada kelompok kontrol positif dibandingkan dengan rerata kelompok kontrol negatif.

Hormon progesteron pada DMPA juga terlibat dalam aktivitasnya dengan reseptor progesteron. Reseptor progesteron yang terdiri dari *progesterone receptor A* (PRA) dan *progesterone receptor B* (PRB) berperan dalam aktivasi

ligan faktor transkripsi dan PRA juga terlibat dalam menghambat aktivitas *estrogen receptor* (ER). Baik PRA maupun PRB berperan penting terhadap aktivitas reproduksi dan non reproduksi wanita (Connely *et al.*, 2003). Reseptor progesteron yang diekspresikan pada sel epitel, stroma dan kompartemen myometrium uterus diregulasi oleh estrogen dan progesteron selama siklus estrus pada tikus atau siklus menstruasi pada wanita (Connely *et al.*, 2003). Kadar progesteron sintetik yang tetap tinggi setelah pemberian DMPA menjadikan kadar estrogen endogen dalam tubuh berkurang regulasi terhadap sintesis reseptor progesteron baik PRA maupun PRB menurun.

Dengan kondisi estrogen yang rendah dan progesteron yang tinggi selama penggunaan DMPA akan berdampak terhadap perdarahan pada endometrium dan atau amenorea akibat perubahan dari reseptor estrogen dan progesteron. Penelitian oleh Sereepapong *et al* (2004) memberikan hasil bahwa ekspresi *progesterone receptor AB*, *progesteron receptor B*, *estrogen receptor a*, dan *estrogen receptor b* baik pada kelenjar dan stroma yang mengalami amenorea dengan kelenjar dan stroma dari pengguna DMPA yang mengalami gangguan perdarahan berkepanjangan tidak berbeda. Namun, pada penelitian lain yang membandingkan antara wanita biasa dengan wanita yang menggunakan DMPA menunjukkan adanya pengurangan yang cukup signifikan pada ekspresi reseptor progesteron. Hasil tersebut menunjukkan bahwa perubahan terhadap reseptor progesteron baik PRA dan PRB berpengaruh terhadap efek samping dari DMPA terutama perdarahan berkepanjangan maupun amenorea.

Untuk meningkatkan ekspresi progesteron diperlukan adanya keseimbangan pada kadar estradiol dan progesteron dalam tubuh yang mengatur siklus menstruasi. Secara normal kadar estradiol yang tinggi pada fase proliferasi pada siklus menstruasi menginduksi baik PRA maupun PRB, sedangkan progesteron yang tinggi pada fase sekresi mengatur penurunan PRA

dan PRB (Graham dan Clarke, 1997; Mote *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2001).

Pemberian estradiol telah dikenal oleh masyarakat dapat digunakan sebagai terapi dalam memperbaiki fungsi reproduksi. Namun efek samping dari pemberian *Estrogen Replacement Therapy* (ERT) terutama pada wanita menopause yang mengalami hipoestrogen memberikan efek samping negatif. Sehingga pemberian bahan alami seperti bengkuang yang diketahui mengandung fitoestrogen golongan daidzein dan genestein diharapkan dapat mengurangi efek samping tersebut. Fitoestrogen yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen (ER) pada sel target di uterus (Prakash & Dubois, 2015).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini setelah didapatkan kondisi hipoestrogen dilanjutkan dengan pemberian terapi ekstrak etanol bengkuang pada kelompok perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya peningkatan ekspresi reseptor progesteron pada tikus yang diberikan terapi ekstrak etanol bengkuang dengan berbagai dosis yang berbeda jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberikan terapi. Hasil menggunakan uji *One Way Anova* juga membuktikan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang pada kelompok perlakuan dengan nilai $p = 0,000$. Jika diamati pada Gambar 5.4 tren dari rerata dosis yang dianggap paling optimal dalam meningkatkan ekspresi progesteron reseptor seperti pada kondisi normal adalah pada kelompok perlakuan P3 dengan dosis 280 mg/200 gBB/hari.

Ekstrak bengkuang mengandung fitoestrogen golongan genestein yang berperan terhadap regulasi dari ekspresi reseptor estrogen dan progesteron.

Penelitian oleh Richter *et al* (2014) membuktikan bahwa kandungan fitoestrogen yang diisolasi dari biji labu dapat meningkatkan produksi estradiol, sebagai *downregulation* ER- α dan *downregulation* PR yang signifikan. Sehingga dalam penelitian ini terbukti bahwa pemberian ekstrak etanol bengkuang yang mengandung fitoestrogen dapat meningkatkan ekspresi reseptor progesteron

melalui peningkatan estradiol dan regulasi dari reseptor estrogen dan progesteron.

Secara umum mekanisme kerja dari fitoestrogen didalam tubuh terdiri dari mekanisme *genomic direct* yaitu melalui ikatan langsung dengan reseptor estrogen pada sel target dan menimbulkan efek seperti layaknya estrogen endogen berupa transkripsi gen. Selain itu terdapat mekanisme *indirect genomic* dengan cara mempengaruhi kadar estrogen endogen dalam sirkulasi. Namun, fitoestrogen juga dapat bekerja tanpa melewati reseptor estrogen (mekanisme *non genomic*) dimana fitoestrogen terutama genestein bekerja sebagai tirosin kinase inhibitor, menginhibisi topoisomerase II atau melalui reseptor membran yang diduga untuk molekul estrogen. Pada kadar estrogen yang rendah, genestein akan berikatan dengan ER yang kosong dan bersifat estrogenik (Prakash & Dubois, 2015).

Pada penelitian ini, pemberian DMPA memberikan respon terhadap tubuh tikus melalui mekanisme penghambatan pelepasan hormon gonadotropin pada hipotalamus dan hipofisis yang berakibat terhambatnya pematangan folikel yang akan menghasilkan estradiol. Rendahnya estradiol dalam tubuh berpengaruh terhadap sintesis dan aktivasi reseptor estrogen dan progesteron yang berperan terhadap sistem reproduksi, akan tetapi pada penelitian ini belum dilakukan pemeriksaan kadar estradiol dalam darah setelah pemberian injeksi DMPA sebanyak 2,7mg setiap 3 hari dan diulang sebanyak 4 kali sehingga tidak diketahui apakah kadar estradiol pada tikus rendah hingga menjadi hipoestrogen. Jika hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa pemberian DMPA sesuai dosis peneliti menyebabkan kadar estradiol rendah maka hasil penelitian ini dapat menjadi referensi bagi perkembangan teori terhadap pembentukan model hipoestrogen selain dengan cara ovariektomi yang biasa dilakukan dan memiliki resiko lebih rendah pada injeksi DMPA jika dibandingkan dengan melakukan ovariektomi. Namun perlu dikaji kembali apakah mekanisme hipoestrogen dan pengaruhnya

terhadap reproduksi dan organ lainnya sama dengan mekanisme pada tikus yang diovariektomi.

Pemberian ekstrak bengkuang sebagai terapi dengan 3 dosis yang berbeda pada penelitian ini memberikan respon terhadap peningkatan pada jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberi terapi. Hal ini karena ekstrak bengkuang memiliki kandungan fitoestrogen golongan isoflavon yang mampu berikatan dengan reseptor estrogen dan bekerja baik secara genomic maupun nongenomic dalam memberikan respon pada target sel sehingga mempengaruhi proliferasi sel dan regulasi terhadap reseptor hormon seks steroid (Primiani, 2015; Richter *et al.*, 2013). Pada penelitian ini dosis ekstrak yang dianggap mampu meningkatkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron mendekati kondisi normal adalah pada kelompok P3 dengan dosis ekstrak etanol Bengkuang tertinggi yaitu 280 mg/200 gBB. Hasil tersebut membuktikan bahwa pemberian fitoestrogen mampu memberikan efek positif terhadap fungsi reproduksi. Namun, perlu dikaji kembali apakah pemberian ekstrak dengan dosis yang lebih tinggi, bervariasi dan rentang dosis yang lebih luas, serta pemberian dalam jangka waktu yang lebih lama dapat berpengaruh positif dan tidak memiliki efek kumulatif sehingga tidak menyebabkan toksisitas bagi penggunaanya.

Jika dilihat dari hasil penelitian dimana dosis tertinggi merupakan dosis yang memberikan efek yang lebih cepat terhadap proliferasi sel dan peningkatan ekspresi reseptor progesteron, hal ini mungkin dapat diketahui bahwa semakin tinggi dosis ekstrak maka kandungan fitoestrogen dalam sediaan juga mungkin juga lebih banyak. Akan tetapi pada penelitian ini tidak diketahui berapa jumlah kandungan fitoestrogen baik genestein maupun daidzein pada ekstrak etanol bengkuang. Perlu dilakukan uji fitokimia untuk menentukan berapa jumlah kandungan isoflavon (daidzein dan genestein) pada ekstrak etanol bengkuang

untuk membuktikan bahwa bengkuang mempunyai efek estrogenik seperti tanaman yang mengandung fitoestrogen lainnya. Karena selain kandungan isoflavon bengkuang juga memiliki kandungan antioksidan berupa isoflavonoid (deidzein; daidzein-7-O- β -glukopiranos; 5-hidroksi-deidzein-7-O- β -glukopiranos) yang semua senyawa tersebut menunjukkan aktivitas penghambat tyrosinase (Lukitaningsih & Holzgrabe, 2014). Senyawa antioksidan juga dapat berperan terhadap pemulihan organ reproduksi akibat kondisi hipoestrogen. Karena estrogen diketahui juga memiliki sifat antioksidan akibat kemampuan mengikat reseptor estrogen dan meningkatkan ekspresi enzim antioksidan melalui jalur pensinyalan intraseluler (Borrás *et al.*, 2010).

6.3. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya:

1. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan kadar estrogen sebagai efek samping dari penggunaan DMPA. Peneliti hanya melakukan pengamatan terhadap kondisi vagina menggunakan swab vagina untuk mendeteksi apakah DMPA telah memberikan efek samping seperti adanya leukosit pada vagina sebagai akibat dari rendahnya kadar estrogen dalam tubuh tikus. Perlu dilakukan juga pengukuran terhadap hormon estrogen setelah pemberian terapi untuk melihat apakah pemberian terapi juga mampu meningkatkan estrogen pada tikus.
2. Pada penelitian ini hanya menggunakan tiga variasi dosis pada kelompok perlakuan sehingga sulit untuk melihat tren grafik efek ekstrak etanol bengkuang dalam berbagai dosis terhadap jumlah sel stroma dan reseptor progesteron.
3. Pada penelitian ini hanya meneliti dua variabel saja yaitu reseptor progesteron dan jumlah sel stroma sehingga pada penelitian berikutnya

dapat menambahkan variabel yang diteliti seperti pengaruh DMPA terhadap keasamaan vagina, peningkatan lendir serviks, keadaan epitel vagina dan lain sebagainya.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada tikus Wistar yang diinjeksi DMPA didapatkan:

- 7.1.1. Pemberian DMPA menurunkan jumlah sel stroma dan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium.
- 7.1.2. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) meningkatkan jumlah sel stroma pada endometrium.
- 7.1.3. Pemberian ekstrak etanol bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) meningkatkan ekspresi reseptor progesteron pada endometrium.

7.2. Saran

- 7.2.1. Diharapkan pada penelitian yang selanjutnya dapat meneliti lebih luas pengaruh pemberian ekstrak etanol bengkuang terhadap efek samping lain yang disebabkan oleh DMPA pada vagina meliputi tingkat keasaman vagina, peningkatan lendir serviks, dan keadaan epitel vagina serta efek samping terhadap organ lain seperti kepadatan tulang dan lain sebagainya.
- 7.2.2. Diharapkan pada penelitian selanjutnya dapat melakukan pemeriksaan terhadap kadar estrogen setelah diberikan injeksi DMPA sehingga membuktikan bahwa DMPA dapat digunakan sebagai metode pengembangan untuk membuat model tikus hipoestrogen selain dengan cara ovariectomi.
- 7.2.3. Diharapkan penelitian selanjutnya dapat dilakukan uji toksisitas dari ekstrak etanol bengkuang, sehingga bisa dilanjutkan penelitian klinis pada manusia tentang efek estrogenik dari fitoestrogen bengkuang sebagai terapi

alternatif bagi wanita pengguna DMPA dalam meningkatkan proliferasi sel-sel endometrium dan berpengaruh terhadap pemulihan kesuburan.



DAFTAR PUSTAKA

- Aydos, S.E., Elhan, A.H., Tükün, A., 2005. Is telomere length one of the determinants of reproductive life span? *Arch, Gynecol Obstet*, 272:113–116.
- Barnett, Anthony. 2001. *The Story of Rats: Their Impact on Us and Our Impact on Them*. Allen & Unwin, Crows Nest NSW Australia. p. 14-15.
- Berger, Cecilia, 2017. *Progesterone receptor modulators in contraception-clinical implications of ovarian and endometrial effects*. Department of Women's and Children's Health Division of Obstetrics and Gynecology Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. p. 18-31.
- Borekci, B., Ingec, M., Kumtepe, Y., Karaca, M., Koc, F., Salman, S., Gulaboglu, M. and Suleyman, H., 2009. Effect of estrogen progesterone LH and FSH on oxidant and antioxidant parameters in rat uterine tissue. *Int J Fertil Steril*, 3(3).
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V. and Viña, J., 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1);205-211.
- Chocksuchat, C., Zhao, S., Deutch, T., Kimble, T., Archer, D., 2009. Effect of progesterone, levonorgestrel and medroxyprogesterone acetat on apoptosis in human endometrial endothelial cells, *Contraception*, 79:139-145.
- Conneely, O M., Mulac-Jericovic, B., Lydon, JP, 2003. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms, *Steroids*, 68:771-778.
- Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, Millar MR and Saunders PT, 2001. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium, *J Clin Endocrinol Metab* 86,1370-1378.
- Cunningham, G. 2006. *Obstetri William vol.1*. EGC. Jakarta. p. 78-80.
- Curtis, K. M., dan Martins, S. L., 2006. Progestogen-only contraception and bone mineral density: a systematic review, *Contraception*, 73:470–487.

Dane, B., Akea, A., Dane, C., Evcimen, S., Cetin, A., 2009. Comparison of the effects of the levonogestrel-releasing intrauterine system (Mirena®) and depot-medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera®) on subendometrial microvascularisation and uterine artery blood flow, *The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care*, 14(3):240–244.

Dinh, A., Sriprasert, J., Williams, A., Archer, D., 2015. A review of endometrial histologic effect of progestins and progesterone receptor modulators in reproductive age women. *Contraception*, 01(008):1-8..

El Fattah, Iman A, 2014. Using phytoestrogens as a prophylaxis against irregular uterine bleeding possibly occurring while using depot-medroxyprogesterone acetate (DMPA) as a contraceptive method. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*, 3(4):977-981.

Findlay, JK, Liew, SH., Simpson, ER., and Korach KS., 2010. Estrogen signalling in the regulation of female reproductive functions. *Fertility Control, Handbook of Experimental Pharmacology* 198, 29-36.

Family Planning Division Ministry of Health and Family Welfare. 2016. *Reference Manual For Injectable Contraceptive (DMPA)*. Government of India. 5-28.

Fauziah, Rahmi K, 2016. *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley*. Institut Pertanian Bogor.

Gordon, L., Thakur, N., Atlas, M., dan Januchowski, R, 2007. Clinical inquiries. What hormonal contraception is most effective for obese women?, *Journal of Family Practice*, 56(6):471–473.

Graham JD and Clarke CL, 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18:502-519.

Haider, Sadia and Darney, Philip, 2007. Injectable Contraception. *Clinical Obstetric and Gynecology*, 50(4):898-906.

Hanekamp, E.E., Gielen, S.C., van Oosterhoud, S.A., Burger, C.W., Grootegoed, J.A., Huikeshoven, F.J. and Blok, L.J., 2003. Progesterone receptors in endometrial cancer invasion and metastasis: development of a mouse model, *Steroids*, 68(10-13):795-800.

Hartanto, H. 2004. *Keluarga Berencana dan Kontrasepsi*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.

Harlow, S.D. 2000. *Menstruation and menstrual disorders: the epidemiology of menstruation and menstrual dysfunction*. In: Goldman, M., Hatch, M. (Eds.), *Women and Health*. Academic Press, San Diego, CA. 99–113.

Hawkins, S dan Matzuk, M, 2008. The Mesntrual Cycle Basic Biology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1135:10–18.

Hegazy, R, Hegazy, A, 2015. DMPA-Induced Changes in estrogen and Progesterone Receptors of Ampulla Rat-oviducts: An Immunohistochemical Study, *Universal Journal of Medical Science*, 3(2), 33-40.

Hickey, M dan Salamonsen, L, 2008. Endometrial structural and inflammatory changes with exogenous progestogens, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19 (5):167-174.

Hickey, M., Higham, J.M. and Fraser, I., 2012. Progestogens with or without oestrogen for irregular uterine bleeding associated with anovulation, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).

Jacobstein, Roy and Polis, Chelsea, 2014. Progestin-Only Contraception: Injectable and Implants. *Besst Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*, 28:795-806.

Johnson MH. 2007. *Essential Reproduction*. 6th ed. New York, NY: Wiley-Blackwell. 316,

Jurkovic, D, Valentin, L, dan Vyas, S. 2009. *Gynaecological ultrasound in clinical practice*. RCOG press, London. 43-52.

Kaunitz, A.M., 2007. Long-acting contraceptives in adolescents, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(5):453-460.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Buku Saku Pelayanan Kesehatan Ibu di Fasilitas Kesehatan Dasar dan Rujukan*. Jakarta. h:242-251.

Kim, S.H. and Park, M.J., 2012. Effects of phytoestrogen on sexual development, *Korean journal of pediatrics*, 55(8):265-271.

Kim, J., Sato, M., Li, Q., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Bagchi, I.C. and Bagchi, M.K., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice, *Molecular and cellular biology*, 28(5):1770-1782.

King TL, Brucker MC, Kriebs JM, Fahey JO. 2013. Varney's midwifery. Jones & Bartlett Publishers.

Kohn, J.E., Simons, H., Della Badia, L., Draper, E., Morfesis, J., Talmont, E., Beasley, A., McDonald, M. and Westhoff, C., 2017. Increased 1-year continuation of DMPA among women randomized to self-administration: results from a randomized controlled trial at Planned Parenthood, *Contraception*, 96(4):266-267.

Lee, D.J., 2017. Care of patients using progestogen-only injectables. *J Fam Plann Reprod Health Care*. 43(1): 67-69.

Lessey BA., 2003. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*. 68(10-13):809-15.

Lohmiller J, Swing SP., 2006. *Reproduction and Breeding*. In M. A. Suckow, S. H. Weisbroth and C. L. Franklin. The Laboratory Rat, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Colombia, USA. p. 147-164,.

Lockwood, C.J., Runic, R., Wan, L., Krikun, G., Demopolous, R. and Schatz, F., 2000. The role of tissue factor in regulating endometrial haemostasis: implications for progestin-only contraception. *Human reproduction*, 15(3):144-151.

Lockwood, C.J., 2011. Mechanisms of normal and abnormal endometrial bleeding. *Menopause* (New York, NY), 18(4):408.

Lukitaningsih, E., 2009. *The exploration of whitening and sun screening compounds in Bengkuang roots (Pachyrhizus erosus)*. Dissertation of Universität Würzburg. 2-28

Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. 2000. *Physiology of reproduction*. In: Krinke GJ (Ed.). The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals. Academic Press, London, UK. p. 145-176.

Maley K, Komasara L. 2003. Introduction to Lab Animal Science [Internet]. Tersedia pada: http://www.medaille.edu/vmacer/120_lab_rodentlab1.htm. diunduh pada 20 September 2018.

Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M. and Eppig, J.J., 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the

- conversation, *Science*, 296(5576):2178-2180.
- Matzuk, M.M. and Lamb, D.J., 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Medicine*, 8(10s), p.S33.
- McLean, A., Valenzuela, N., Fal, S., Bennett, S, 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification, *Jove. Vis. Exp.* (67), e4389.
- Mélo, E.A., Stamford, T.L.M., Silva, M.P.C., Krieger, N. and Stamford, N.P., 2003. Functional properties of yam bean (*Pachyrhizus erosus*) starch. *Bioresource technology*, 89(1):103-106.
- Messina, M., Messina, V.L. and Chan, P., 2011. Soyfoods, hyperuricemia and gout: a review of the epidemiologic and clinical data, *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 20(3):347-358.
- Mihm, M., Gangooly, S. and Muttukrishna, S., 2011. The normal menstrual cycle in women, *Animal reproduction science*, 124(3-4):229-236.
- Mote, P.A., Balleine, R.L., McGowan, E.M. and Clarke, C.L., 2000. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma, *Human reproduction*, 15(3):48-56.
- Mtawali, G., Pina, M., Angle, M. and Murphy, C., 1997. *The menstrual cycle and its relation to contraceptive methods: A reference for reproductive health trainers*. INTRAH, Colombia. p. 5-12.
- Nelson, A.L., 2010. DMPA: battered and bruised but still needed and used in the USA. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 5(6):673-686.
- Noman, A.S.M., Hoque, M.A., Haque, M.M., Pervin, F. and Karim, M.R., 2007. Nutritional and anti-nutritional components in *Pachyrhizus erosus* L. tuber. *Food chemistry*, 102(4):1112-1118.
- Norwitz E., Schorge J. 2007. *At a Glance Obstetri dan Ginekologi*. Erlangga. Jakarta.
- Nurrochmad, A., Leviana, F., Wulancarsari, C.G. and Lukitaningsih, E., 2010. Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis, *International Journal of Phytomedicine*, 2(4):363-372.

Pamuji, E.S., Dasuki, D., Sanger, O., Sudradjat, F.J., 2008. Pengaruh Kontrasepsi Hormonal Planibu® Versus Depo Progestin® terhadap Fungsi Hepar dan Profil Lipid. *Berita Kedokteran Masyarakat*, 24(3):156.

Park, S.J., Goldsmith, L.T. and Weiss, G., 2002. Age-related changes in the regulation of luteinizing hormone secretion by estrogen in women, *Experimental Biology and Medicine*, 227(7):455-464.

Pfizer. 2009. Depo-subQ provera 104TM physician information. Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfdadocs/label/2009/>. Downloaded on September, 20, 2018.

Parhizkar, S., Latiffsup, L.A., Rahmansup, S.A., Dollahsup, M.A. and Parichehr, H., 2011. Assessing estrogenic activity of *Nigella sativa* in ovariectomized rats using vaginal cornification assay, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(2):137-142.

Popat, V.B., Prodanov, T., Calis, K.A. and Nelson, L.M., 2008. The menstrual cycle, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135(1):43-51.

Prakash I, Dubois GE. 2015. High-potency sweetener composition with phytoestrogen and compositions sweetened therewith. *Google Patents*.

Primiani, C.N., 2013. Comparative study of effects daidzein contained in Yam tuber (*Pachyrhizus erosus*) and pure deidzein: the dinamycs of chemical compounds and potential in myometrium, *Journal of Biology Researches*, 18:122-125.

Primiani C.N., 2011. Dinamika Senyawa Daidzein Umbi Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dalam Darah serta Potensinya pada Tikus Putih Betina. *Jurnal* ;1-7.

Primiani C.N., 2013 Potensi Tepung Tempe sebagai Estrogen Alami terhadap Uterus Mencit Premenopause The Powder of Tempe as Natural Estrogen on Mice's Premenopause. 1(2):47-51.

Primiani C.N., 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):5-9.

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):49-54.

Rani, S., 2017. A study on injectable DMPA (Depomedroxy progesterone acetate) isomg use as short-term contraception in immediate postpartum women. *International Journal of Medical and Health Research*, 3(9):17-22.

RANZCOG (The Royal Australian and New Zealand College of Obstetricians and Gynaecologists). 2015. *Depot Medroxyprogesterone Acetate*. RANZCOG. p. 3-11.

Reddy, P.P., 2015. *Plant protection in tropical root and tuber crops*. Springer, India. p. 143-192.

Reji, A.F. and Alphonse, N.R., 2013. Phytochemical study on *Sesbania grandiflora*. *Journal of chemical and pharmaceutical Research*, 5(2):196-201.

Retana-Márquez, S., Aguirre, F.G., Alcántara, M., García-Díaz, E., Muñoz-Gutiérrez, M., Arteaga-Silva, M., López, G., Romero, C., Chemineau, P., Keller, M. and Delgadillo, J.A., 2012. Mesquite pod extract modifies the reproductive physiology and behavior of the female rat. *Hormones and behavior*, 61(4):549-558.

Richter, D., Abarzua, S., Chrobak, M., Vrekoussis, T., Weissenbacher, T., Kuhn, C., Schulze, S., Kupka, M.S., Friese, K., Briese, V. and Piechulla, B., 2013. Effects of phytoestrogen extracts isolated from pumpkin seeds on estradiol production and ER/PR expression in breast cancer and trophoblast tumor cells. *Nutrition and cancer*, 65(5):739-745.

Sengupta, P., 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6):624.

Sereepapong, W., Chotnopparatpattara, P., Taneepanichskul, S., Markham, R., Russell, P. and Fraser, I.S., 2004. Endometrial progesterone and estrogen receptors and bleeding disturbances in depot medroxyprogesterone acetate users. *Human Reproduction*, 19(3):547-552.

Shoupe, D. and Kjos, S.L., 2006. *The handbook of contraception*. Humana Press Incorporated. Totowa New Jersey. p. 101-110.

Sierra-Ramírez, J.A., Lara-Ricalde, R., Lujan, M., Velázquez-Ramírez, N.,

- Godínez-Victoria, M., Hernández-Munguía, I.A., Padilla, A. and Garza-Flores, J., 2011. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics after subcutaneous and intramuscular administration of medroxyprogesterone acetate (25 mg) and estradiol cypionate (5 mg). *Contraception*, 84(6):565-570.
- Sim, J. and Wright, C., 2000. *Research in health care: concepts, designs and methods*. United Kingdom. Nelson Thornes Ltd. 27-28.
- Speroff, L. and Fritz, M.A. eds., 2005. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Philadelphia USA. Lippincott Williams & Wilkins. 825-830.
- Speroff, L. dan Darney, P. 2005. *Pedoman Klinis Kontrasepsi*. Kedokteran EGC. Jakarta. p. 20.
- Speroff, L. and Darney, P.D., 2010. *A clinical guide for contraception*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia USA. p. 217.
- Strauss, J.F. and Barbieri, R.L., 2013. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology E-Book: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. Elsevier Health Sciences. Philadelphia. 66.
- Subakir, S.B., Madjid, O.A., Sabariah, S. and Affandi, B., 2000. Oxidative stress, vitamin E and progestin breakthrough bleeding. *Human Reproduction*, 15(3):18-23.
- Suckow MA, Steven HW, Craig LF. 2006. *The Laboratory Rat. 2nd Edition*. Academic Pr. California (USA). 30.
- Supranto, J., 2000. *Teknik sampling untuk survei dan eksperimen*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Swarjana, I.K. and SKM, M., 2012. *Metodologi penelitian kesehatan*. Penerbit Andi.
- Tang, Z., Gong, S., Dai, Z., Li, X., Ou, L., dan Xu, J. 2008. Preliminary study on acute toxicity of different extracts of *Pachyrhizus erosus* Urban seed on KB cell. *Nutrition Health, Food Science*, 29:435-437.
- Tsutsumi A, Okada H, Nakamoto T, Okamoto R, Yasuda K, Kanzaki H., 2011. Estrogen induces stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) production in human endometrial stromal cells: a possible role of endometrial epithelial cell growth. *Fertil Steril*, 95(1):444-7.

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, Surakarta, Universitas Sebelas Maret.

Tuominen, V.J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M. and Isola, J., 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast cancer research*, 12(4), R56.

Veisi, F. and Zangeneh, M., 2013. Comparison of two different injectable contraceptive methods: Depo-medroxy progesterone acetate (DMPA) and cyclofem, *Journal of family & reproductive health*, 7(3):109.

Veri, N., 2015. *Pengaruh Ekstrak Teh Hijau terhadap Ekspresi eNos dan Indeks Apoptosis Endometrium Rattus norvegicus yang Di Papar Depo Medroksi Progesteron Asetat*. Malang, Universitas Brawijaya.

Wahyuni, Endang, S. 2016. *Kontrasepsi Hormonal Progesteron*. Surakarta, Penerbit Pustaka Hanif. 1-40.

World Health Organization. 2005. WHO statement on hormonal contraception and bone health. *Weekly Epidemiological Record*, 35, 302–304. Retrieved from [http://whqlibdoc.who.int/wer/WHO_WER_2005/80_297-304\(no35\)](http://whqlibdoc.who.int/wer/WHO_WER_2005/80_297-304(no35).). Downloaded on September, 15, 2018.

Zanni, P.C., Negri, M., Salci, T.P., Bonfim-Mendonca, P.D.S., Kioshima, E.S., Svidzinski, T.I. and Consolaro, M.E., 2014. Animal models for the effective development of atrophic vaginitis therapies: possibilities and limitations, *Expert opinion on drug discovery*, 9(3):.269-281.

Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 531611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 52 / EC / KEPK - S2 / 02 / 2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

- JUDUL** : Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) terhadap Sistem Reproduksi pada Model Tikus Wistar Model Hipoestrogen dengan Injeksi DMPA.
- PENELITI UTAMA** : Suryanti S, S.Keb.,Bd
Eka Frenty Hadiningsih, SST
Mayasari Putri Ardela, S.Keb.,Bd
- UNIT / LEMBAGA** : S2 Kebidanan - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.
- TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Sentral Biomedik dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Institut Biosains Universitas Brawijaya, dan UPT Materia Medica Kota Batu.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Prof. Dr. dr. Moch Jusiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)
NIPK. 20180246051611001

Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Pelaksanaan Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2 Surat Keterangan Ekstrak Bengkuang

Lampiran 3 Surat Keterangan Ekstrak



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

SURAT KETERANGAN EKSTRAK

No. 074 / 18C / 102.7 / 2019

Bersama ini kami sampaikan hasil ekstraksi berikut ini :

1. Identitas Pemohon

NAMA	NIM	
SURYANTI S	176070400111006	FAKULTAS KEDOKTERAN
MAYASARI PUTRI ARDELA	176070400111013	UNIVERSITAS BRAWIJAYA
EKA FRENTY HADININGSIH	176070400111025	

2. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Bengkoang
Nama latin : *Pachyrhizus erosus*
Bagian sampel : Buah
Bentuk sampel : Serbuk
Asal sampel : Malang
Jumlah sampel : 300 gram

3. Hasil

No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 kali
	c. Pelarut	Etanol 96%
	d. Jumlah pelarut	2400 ml
	e. Waktu evaporasi	1,5 jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Kadar air	-
	d. Berat / volume	34 ml

4. Pustaka

- Ditjen POM, 1986. "Sediaan Galenik", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Sudjadi, 1986. "Metode Pemisahan", UGM Press, Yogyakarta.
- Nugroho, Agung. 2017. "Teknologi Bahan Alam". Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 6 Maret 2019
Kepala UPT Laboratorium Herbal
Materia Medica Batu



Lampiran 3 Surat Keterangan Pembelian Tikus



UD. ABADI JAYA
PETERNAKAN HEWAN UJI

Jl. Ring Road Utara, Gandok gg. Narodo No: 3X, Condong Catur, Depok
Sleman, Yogyakarta 55283, Telp. 083840598002, 085228117444

ABADI JAYA

SURAT KETERANGAN

No. 98 / AJ / 32 / IV / 2019

Yang bertanda tangan dibawah ini atas nama UD. ABADI JAYA menerangkan bahwa

Nama : Eka Frenty Hadiningsih Nim : 176070400111025

Institusi : Universitas Brawijaya

Prodi : S2 Kebidanan

Alamat : Jl. Veteran, Malang

Telah melakukan pembelian (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jenis kelamin Betina, dalam keadaan sehat.

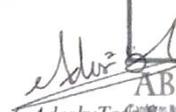
Guna Penelitian Dengan Judul :

Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) Terhadap Sistem Reproduksi Pada Model Tikus Wistar Hipoestrogen dengan DMPA

Pembelian dilakukan pada tanggal 11 Februari 2019

Demikian, semoga surat keterangan ini dapat digunakan sebaik-baiknya.

Yogyakarta, 11 Februari 2019


ABADI JAYA
Adesky Tofa S1
Telp. 083840598002

Lampiran 4 Surat Keterangan LOA

7/11/2019

ICoLiST 2019 - Letter of Acceptance

Print this page



ICoLiST 2019

International Conference on Life Sciences and Technology 2019
THE IOI Malang OJ Hotel, 12 September 2019
Website: <http://icolist.biologi.um.ac.id/2019>
Email: icolist.biologi@um.ac.id

Date: 11 July 2019

Letter of Acceptance

Dear Authors: Eka Frenty Hadiningsih (1,5,a), Mayasari Putri Ardela (1,b), Suryanti S (1,6,b), Tatit Nurseta (2), Noorhamdani (3), Sri Winarsih (3), Kenty Wantri Anita (4), Aina Angelina (4)

We are pleased to inform you that your abstract (ABS-22, Oral Presentation), entitled:

"The Effect Of Bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) Ethanol Extract On The Number Of Ovarian Follicles, And Amount Of Epithelium And Endometrium Stroma In DMPA-Treated *Rattus norvegicus*"

has been reviewed and accepted to be presented at ICoLiST 2019 conference to be held on 12 September 2019 in Malang, Indonesia.

Please submit your full paper and make the payment for registration fee before the deadlines, visit our website for more information.

Thank You.

Best regards,

Hendra Susanto, S.Pd., M.Kes., Ph.D.
ICoLiST 2019 Chairperson



Lampiran 5 Hasil SPSS Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	kelompok pengamatan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ekspresi progesterone receptor	kontrol (-)	.311	5	.127	.840	5	.165
	kontrol (+) (DMPA)	.145	5	.200*	.985	5	.957
	P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	.239	5	.200*	.865	5	.248
	P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	.327	5	.086	.827	5	.131
	P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	.306	5	.141	.879	5	.303

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

	kelompok pengamatan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah sel stroma endometrium	kontrol (-)	.246	5	.200*	.940	5	.664
	kontrol (+) (DMPA)	.254	5	.200*	.837	5	.156
	P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	.292	5	.190	.845	5	.180
	P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	.207	5	.200*	.951	5	.747
	P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	.225	5	.200*	.888	5	.345

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 6 Hasil SPSS Uji One Way Anova dan Uji Duncan

Oneway

Descriptives

ekspresi progesterone receptor

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol (-)	5	68.1760	6.46499	2.89123	60.1487	76.2033	59.52	73.82
kontrol (+) (DMPA)	5	43.9880	8.08471	3.61559	33.9495	54.0265	32.66	53.48
P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	5	50.9360	5.12701	2.29287	44.5700	57.3020	45.16	56.28
P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	5	56.4880	6.05433	2.70758	48.9706	64.0054	51.46	66.68
P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	5	66.9800	3.76266	1.68271	62.3080	71.6520	63.36	73.16
Total	25	57.3136	10.97121	2.19424	52.7849	61.8423	32.66	73.82

ANOVA

ekspresi progesterone receptor

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2151.790	4	537.948	14.598	.000
Within Groups	737.030	20	36.851		
Total	2888.820	24			

Post Hoc Test Duncan
Homogeneous Subsets

ekspresi progesterone receptor

	kelompok pengamatan	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	kontrol (+) (DMPA)	5	43.9880		
	P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	5	50.9360	50.9360	
	P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	5		56.4880	
	P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	5			66.9800
	kontrol (-)	5			68.1760
	Sig.		.085	.164	.759

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Oneway

Descriptives

jumlah sel stroma endometrium

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol (-)	5	175.60	30.973	13.851	137.14	214.06	143	221
kontrol (+) (DMPA)	5	105.40	12.219	5.464	90.23	120.57	85	115
P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	5	121.60	2.793	1.249	118.13	125.07	117	124
P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	5	131.00	4.243	1.897	125.73	136.27	125	136
P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	5	165.00	26.514	11.857	132.08	197.92	141	206
Total	25	139.72	32.206	6.441	126.43	153.01	85	221

ANOVA

jumlah sel stroma endometrium

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17543.440	4	4385.860	11.935	.000
Within Groups	7349.600	20	367.480		
Total	24893.040	24			

Post Hoc Test Duncan Homogeneous Subsets

jumlah sel stroma endometrium

	kelompok pengamatan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	kontrol (+) (DMPA)	5	105.40	
	P1 (DMPA + Eks. Bengkuang 70mg/200gr BB)	5	121.60	
	P2 (DMPA + Eks. Bengkuang 140mg/200gr BB)	5	131.00	
	P3 (DMPA + Eks. Bengkuang 280mg/200gr BB)	5		165.00
	kontrol (-)	5		175.60
	Sig.			.058

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 7 Hasil SPSS Uji Korelasi Spearman

Nonparametric Correlations

Correlations

			dosis ekstrak Bengkuang	ekspresi progesterone receptor	jumlah sel stroma endometrium
Spearman's rho	dosis ekstrak Bengkuang	Correlation Coefficient	1.000	.756**	.947**
		Sig. (2-tailed)	.	.001	.000
		N	15	15	15
	ekspresi progesterone receptor	Correlation Coefficient	.756**	1.000	.767**
		Sig. (2-tailed)	.001	.	.001
		N	15	15	15
	jumlah sel stroma endometrium	Correlation Coefficient	.947**	.767**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.001	.
		N	15	15	15

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 8 Penghitungan Dosis Ekstrak Etanol Bengkuang (*Pachyrhizus erosus*)

Volume sediaan ekstrak etanol bengkuang = 34 mL

Total kebutuhan dosis ekstrak etanol bengkuang pada tikus dengan BB 200 g

P1 : 70 mg x 5 ekor tikus x 14 hari = 4900 mg

P2 : 140 mg x 5 ekor tikus x 14 hari = 9800 mg

P3 : 280 mg x 5 ekor tikus x 14 hari = 19600 mg

Total 34300 mg

34 mL ekstrak etanol bengkuang = 34300 mg

1 mL ekstrak etanol bengkuang = 1008,8 mg

1. Kebutuhan ekstrak etanol bengkuang 1 tikus dengan BB 200 g pada P1 (dosis ekstrak etanol bengkuang 70 mg/200 g BB)

$$\frac{1 \text{ mL}}{x \text{ mL}} = \frac{1008,8 \text{ mg}}{70 \text{ mg}}$$

$$x = \frac{70 \text{ mg}}{1008,8 \text{ mg}}$$

$$= 0,07 \text{ mL / tikus / hari}$$

Kebutuhan untuk pemberian selama 14 hari sebanyak 0,98 mL

2. Kebutuhan ekstrak etanol bengkuang 1 tikus dengan BB 200 g pada P2 (dosis ekstrak etanol bengkuang 140 mg/200 g BB)

$$\frac{1 \text{ mL}}{x \text{ mL}} = \frac{1008,8 \text{ mg}}{140 \text{ mg}}$$

$$x = \frac{140 \text{ mg}}{1008,8 \text{ mg}}$$

$$= 0,14 \text{ mL / tikus / hari}$$

Kebutuhan untuk pemberian selama 14 hari sebanyak 1,96 mL

3. Kebutuhan ekstrak etanol bengkuang 1 tikus dengan BB 200 g pada P3 (dosis ekstrak etanol bengkuang 280 mg/200 g BB)

$$\frac{1 \text{ mL}}{x \text{ mL}} = \frac{1008,8 \text{ mg}}{280 \text{ mg}}$$

$$x = \frac{280 \text{ mg}}{1008,8 \text{ mg}}$$

$$= 0,28 \text{ mL / tikus / hari}$$

Kebutuhan untuk pemberian selama 14 hari sebanyak 3,92 mL

Lampiran 9 Foto Dokumentasi Penelitian

1. Persiapan pembuatan ekstrak Bengkuang



2. Penghitungan dosis Bengkuang



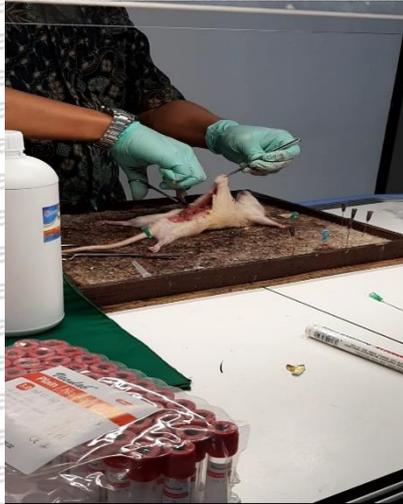
3. Pemeliharaan hewan coba



4. Injeksi DMPA dan sonde ekstrak Bengkuang



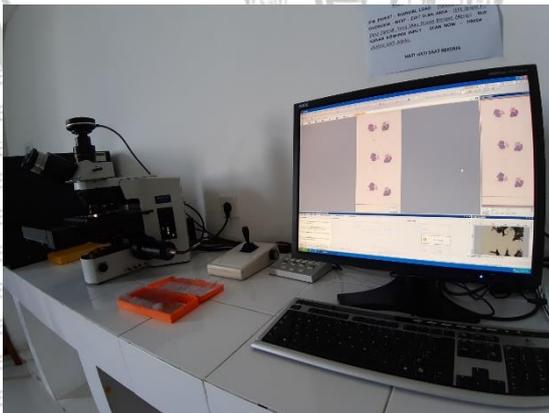
5. Pembedahan tikus dan pengambilan sampel darah



6. Pembuatan preparat histopatologi dan Imunohistokimia



7. Pengamatan histopatologi dan imunohistokimia menggunakan mikroskop *dot slide Olympus SC10* yang telah dilengkapi dengan digital kamera *Optilab +12 Megapixel* dan *software* pengolahan gambar *Optilab Viewer*.



Lampiran 10 Surat Bebas Plagiasi

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN

Hal : Permohonan Surat Keterangan Bebas Plagiasi

Yth. Ketua Badan Penerbitan Jurnal
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Malang

Sehubungan dengan telah dilakukannya deteksi plagiasi mahasiswa Program Studi Magister
Kebidanan :
Nama : Eka Frenty Hadiningsih
NIM : 176070400111025

Maka dengan ini kami mohon untuk diterbitkannya Pernyataan Bebas Plagiasi bagi artikel yang
telah memenuhi kriteria deteksi kemiripan menggunakan *Turnitin* dengan judul sebagai berikut :

Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Bengkoang terhadap Jumlah Sel Stroma
dan Ekspresi Progesterone Receptor pada Tikus Wistar Model
Hipoestrogen dengan DMPA
Hasil Cek : 4 %
Jumlah Halaman : 84

Demikian, atas perhatian dan kerjasamanya kami sampaikan terima kasih.

Malang,
Koordinator Money Tesis,


dr. Anih Indriani, SpOG
NIK 2016098007042001



RIWAYAT HIDUP

Eka Frenty Hadiningsih, lahir di Bontang, 09 Maret 1991 anak pertama dari tiga bersaudara putri dari bapak Prihadi dan ibu Winarningsih. Lulus SD Negeri 01 Pulung pada tahun 2003, lulus SMP Negeri 01 Pulung pada tahun 2005, lulus SMA Negeri 01 Pulung pada tahun 2008. Pada tahun 2008 melanjutkan Pendidikan DIII Kebidanan di STIKES Bahrul Ulum Jombang lulus tahun 2011. Melanjutkan Pendidikan DIV Kebidanan di Universitas Kediri Kediri pada tahun 2012 dan lulus pada tahun 2013. Pada tahun 2017 mengambil Pendidikan program studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2014 sampai saat ini peneliti bekerja di STIKES Wiyata Husada Samarinda Kalimantan Timur.

