



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM
(*Glycine soja*) TERHADAP STRUKTUR OVARIUM DAN
SIKLUS ESTRUS PADA MENCIT OVARIEKTOMI
UNILATERAL STRAIN SWISS WEBSTER**

SKRIPSI

Oleh
Nindita Fitria Primasari
NIM 121810401001

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine soja*)
TERHADAP STRUKTUR OVARIUM DAN SIKLUS ESTRUS PADA
MENCIT OVARIIEKTOMI UNILATERAL
STRAIN SWISS WEBSTER**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Nindita Fitria Primasari
NIM 121810401001**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Bunda Dra. Ambar Utari dan Ayah Bambang Rudiyanto, terimakasih atas segala limpahan doa, kasih sayang, pengorbanan dan dukungannya yang tiada henti;
2. Keluarga besar Alm. Soekijono dan Alm. H. Yasir H.;
3. Semua guru yang telah mendidik dari sekolah dasar hingga perguruan tinggi, terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang kalian berikan;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, maka apabila engkau telah selesai dari suatu urusan, tetaplah bekerja keras untuk urusan yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”

(Surat Al- Insyirah ayat 6 - 8*)

“Hai orang – orang yang beriman, jadikanlah sabar dan shalatmu sebagai penolongmu, sesungguhnya ALLAH beserta orang – orang yang sabar”

(Al – Baqarah: 153**)

*) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah / Penafsiran Al Qur'an. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bogor: Nur Publishing.

***) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumusdasmoro Grafindo

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nindita Fitria Primasari

NIM : 121810401001

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Struktur Ovarium dan Siklus Estrus Pada Mencit Ovariectomi Unilateral Strain Swiss Webster” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dra.Mahriani, M.Si dan tidak dapat dipublikasikan tanpa izin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 5 April 2019

Yang Menyatakan,

Nindita Fitria Primasari

NIM 121810401001

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine soja*)
TERHADAP STRUKTUR OVARIUM DAN SIKLUS ESTRUS PADA
MENCIT OVARIIEKTOMI UNILATERAL
STRAIN SWISS WEBSTER**

Oleh

Nindita Fitria Primasari
NIM 121810401001

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Histologi Ovarium Mencit Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 5 April 2019

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dra.Mahriani, M.Si
NIP. 195703151987022001

Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si
NIP. 197306012000032001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd
NIP. 195805281988021002

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si
NIP. 196411051989022001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
196102041987111001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (Glycine soja) Terhadap Histologi Ovarium Mencit Strain Swiss Webster Ovariectomi Unilateral;
Nindita Fitria Primasari; 121810401001; 2019: 25 halaman; Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Fitoestrogen merupakan suatu senyawa yang bersifat estrogenik yang berasal dari tumbuhan. Fitoestrogen dapat digolongkan menjadi isoflavon dan lignan. Isoflavon merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang banyak dijumpai pada kedelai. Kedelai hitam memiliki kandungan fenolik, tanin, antosianin dan isoflavon serta aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding kedelai kuning. Kedelai hitam memiliki kandungan flavonoid 6 kali lebih banyak dibanding kedelai kuning. Kandungan total flavonoid kedelai hitam (2,57) dan kuning (0,41) serta memiliki aktivitas antioksidan 15 kali lebih tinggi. Dengan kandungan flavonoid yang tinggi tersebut, kedelai hitam dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber fitoestrogen dari luar tubuh yang berpengaruh terhadap sistem reproduksi betina.

Salah satu organ reproduksi betina yang dapat dipengaruhi oleh fitoestrogen adalah ovarium. Ovarium berfungsi sebagai penghasil sel telur dan menghasilkan hormon reproduksi yaitu estrogen dan progesteron. Estrogen berperan dalam merangsang perkembangan kelenjar mammae, merangsang siklus estrus dan persiapan uterus untuk implantasi. Sedangkan progesteron berperan dalam mengatur siklus menstruasi. Produksi estrogen dapat berkurang akibat menopause dan ovariectomi. Penurunan kadar estrogen dalam tubuh menyebabkan perubahan fisiologis pada sistem reproduksi betina. Oleh sebab itu, diperlukan asupan hormon estrogen dari luar tubuh, dalam hal ini fitoestrogen dari kacang-kacangan dapat dimanfaatkan untuk menggantikan peran estrogen endogen. Mekanisme kerja fitoestrogen dalam jaringan adalah dengan berikatan pada reseptor estrogen.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi unilateral yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan dosis 1 (0,21 g/ml/hari), kelompok perlakuan dosis 2 (0,42 g/ml/hari), dan kelompok perlakuan dosis 3 (0,63 g/ml/hari). Ekstrak tepung kedelai hitam diberikan secara *gavage*. Perlakuan dilakukan selama 10 hari. pembuatan preparat histologi ovarium dengan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop yang meliputi jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf. Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 99 % atau $\alpha = 0,01$ untuk mengetahui pengaruh dosis dan pengaruh lama perlakuan, dilanjutkan dengan Uji Duncan untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian, pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada mencit ovariektomi unilateral cenderung dapat meningkatkan rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf.

PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Struktur Ovarium dan Siklus Estrus Pada Mencit Ovariectomi Unilateral Strain Swiss Webster”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dra. Mahriani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd., selaku Dosen Penguji I dan Dra. Susantin Fajariyah, M.Si., selaku Dosen Penguji II, yang memberikan saran serta kritik dalam penulisan skripsi ini;
3. Ir. Efie Fadjriyah E.D selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak membantu selama penelitian berlangsung;
4. kedua orang tua tercinta, dan keluarga besarku terima kasih atas limpahan kasih sayang, pengorbanan, motivasi dan doanya yang tiada henti demi terselesaikannya skripsi ini;
5. Rekan kerjaku selama penelitian Yurinda Mariya, Fita Aprilia, Dewi Lina Suryani, dan Dwi Erlinda terima kasih atas kerjasamanya dan bantuannya selama penelitian;
6. adik-adik laboratorium zoologi Yenny, Maulfi, Lidya, Elok, Hilda, Rilla, Isna, Reno terima kasih atas bantuannya;
7. sahabat saya Bambang Edi Suwarno terimakasih atas semangatnya hingga skripsi ini dapat selesai;

8. sahabat saya Renitaningtyas Marisa K., Mira Fanesti, Kusuma Adhi W.A., Amalia Trias Roshanty terimakasih sudah menjadi sahabat terbaik;
9. teman-teman tercinta angkatan 2012 (BIOZVA) Jurusan Biologi Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu;
10. Semua pihak yang telah membantu tenaga, semangat, dan pikiran yang tidak dapat disebutkan satu persatu oleh penulis dalam kelancaran penulisan skripsi ini.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 5 April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|-----------|
| HALAMAN SAMPUL..... | i |
| HALAMAN JUDUL | ii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | iii |
| HALAMAN MOTO | iv |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | v |
| HALAMAN PEMBIMBING | vi |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vii |
| RINGKASAN | viii |
| PRAKATA | x |
| DAFTAR ISI..... | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Batasan Masalah | 2 |
| 1.4 Tujuan..... | 3 |
| 1.5 Manfaat..... | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 Struktur Histologi dan Perkembangan Folikel Ovarium | 4 |
| 2.2 Komposisi Senyawa Kimia pada Biji Kedelai Hitam dan Pengaruhnya pada Organ Reproduksi | 7 |
| 2.3 Hipotesis..... | 9 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN..... | 10 |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 10 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 10 |
| 3.3 Rancangan Penelitian | 11 |

| | |
|---|----|
| 3.4 Alur Penelitian | 12 |
| 3.5 Metode Penelitian | 13 |
| 3.5.1 Persiapan Hewan Uji | 13 |
| 3.5.2 Ovariektomi Mencit..... | 13 |
| 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Tepung Kedelai Hitam..... | 14 |
| 3.5.4 Perlakuan Hewan Uji | 14 |
| 3.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Ovarium | 15 |
| 3.6 Parameter yang diamati | 16 |
| 3.7 Analisis Data | 16 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 17 |
| 4.1 Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam Terhadap Jumlah Folikel Primordial, Folikel Primer, Folikel Sekunder dan Folikel de Graaf Mencit Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral | 17 |
| BAB 5. PENUTUP | 22 |
| 5.1 Kesimpulan | 22 |
| 5.2 Saran | 22 |
| DAFTAR PUSTAKA | 23 |
| LAMPIRAN | 26 |

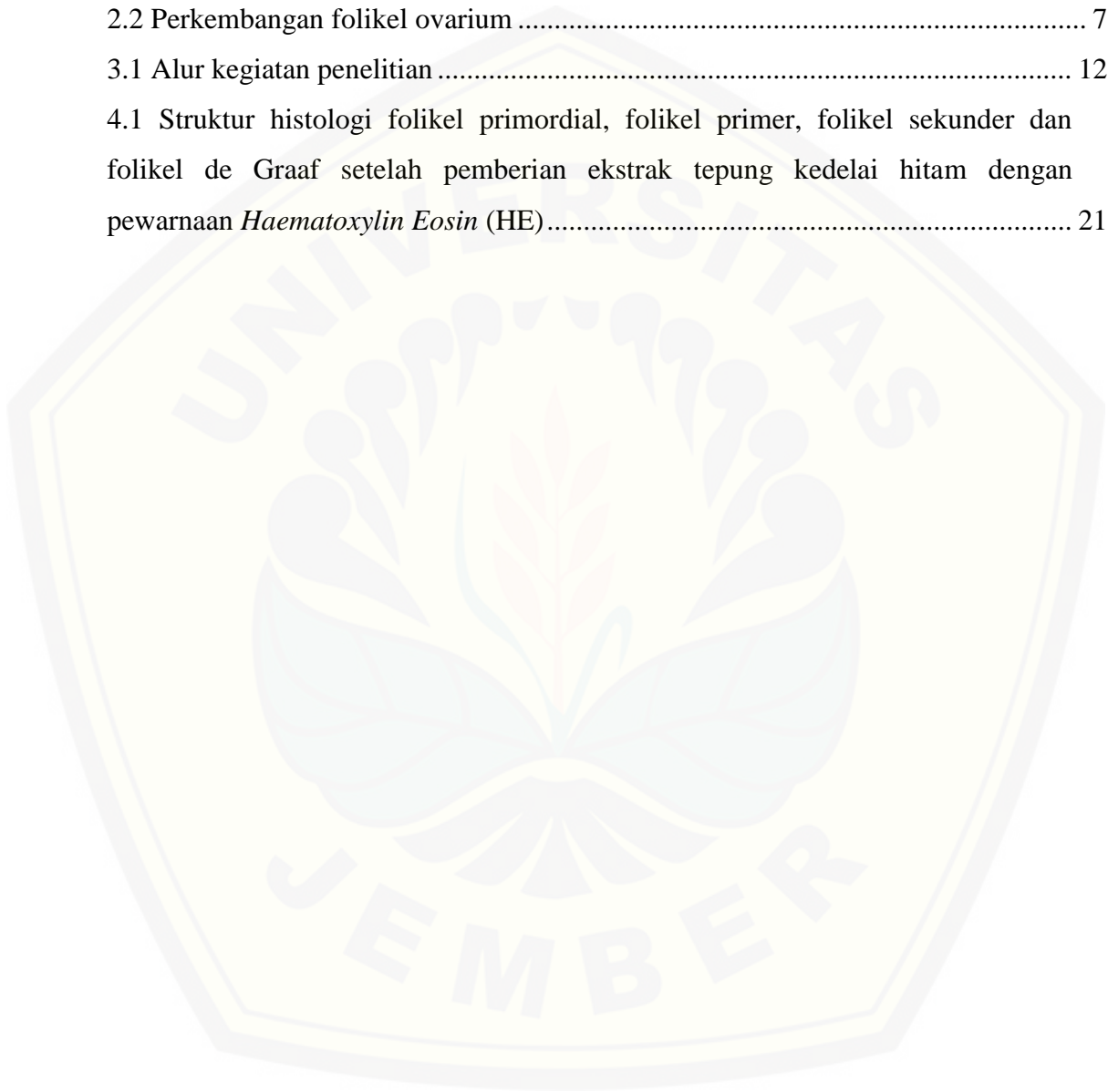
DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 4.1 Rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf mencit strain Swiss Webster ovariektomi unilateral setelah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam..... | 17 |



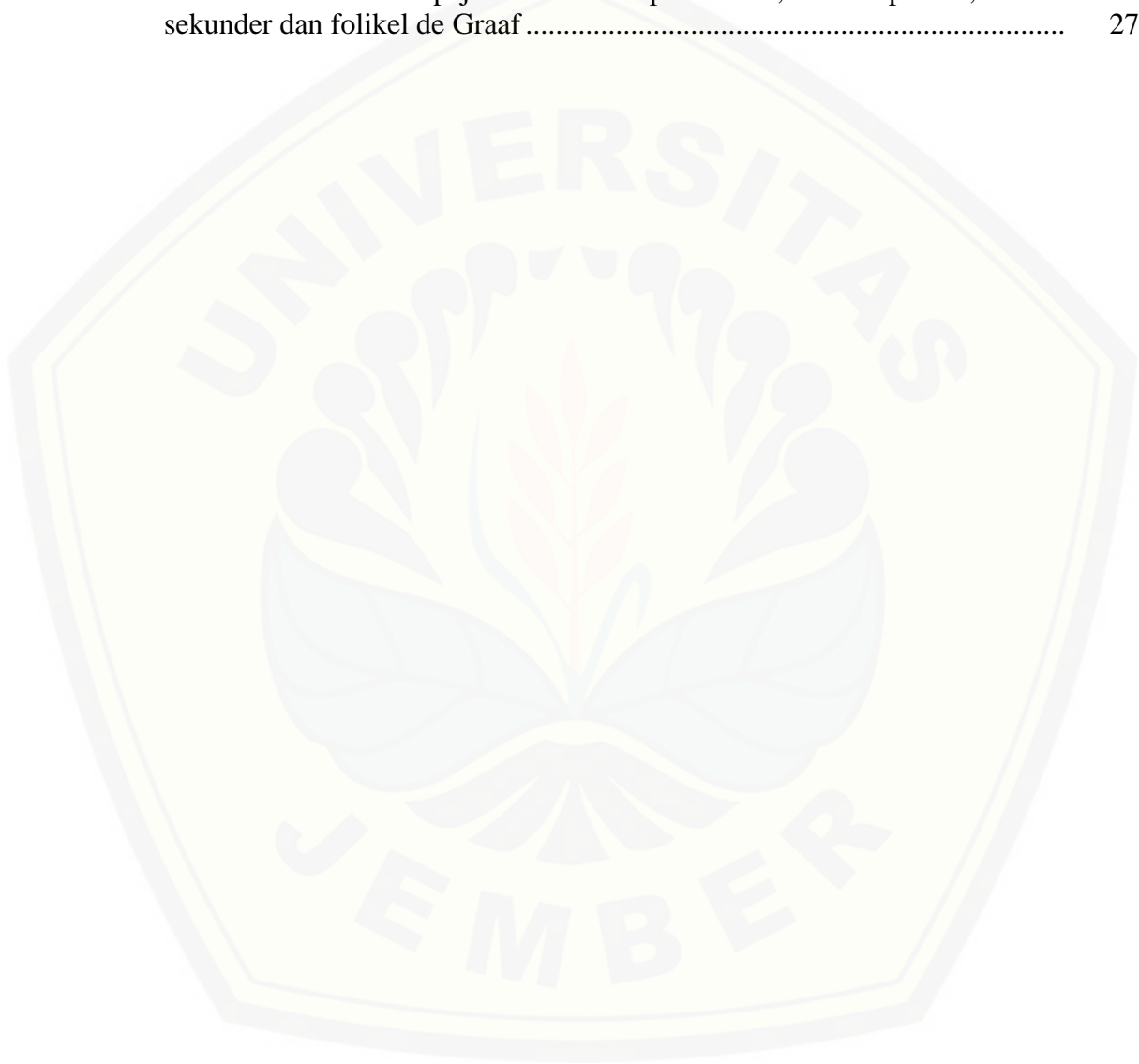
DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Struktur histologi ovarium | 4 |
| 2.2 Perkembangan folikel ovarium | 7 |
| 3.1 Alur kegiatan penelitian | 12 |
| 4.1 Struktur histologi folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf setelah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dengan pewarnaan <i>Haematoxylin Eosin</i> (HE)..... | 21 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| A. Penentuan dosis | 26 |
| B. Hasil analisis Oneway ANOVA dan uji Duncan pengaruh ekstrak tepung kedelai hitam terhadap jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf | 27 |





**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG KEDELAI HITAM
(*Glycine soja*) TERHADAP HISTOLOGI OVARIUM MENCIT STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIEKTOMI UNILATERAL**

SKRIPSI

Oleh:

Nindita Fitria Primasari

NIM 121810401001

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2019

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Fitoestrogen merupakan suatu senyawa yang bersifat estrogenik yang berasal dari tumbuhan. Fitoestrogen dapat digolongkan menjadi isoflavon dan lignan. Isoflavon merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang banyak dijumpai pada kedelai.

Kedelai hitam memiliki kandungan fenolik, tanin, antosianin dan isoflavon serta aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding kedelai kuning (Xu dan Chang, 2007). Menurut Xu dan Chang (2007) kedelai hitam memiliki kandungan flavonoid 6 kali lebih banyak dibanding kedelai kuning. Kandungan total flavonoid kedelai hitam (2,57 mg) dan kedelai kuning (0,41mg), serta memiliki aktivitas antioksidan 15 kali lebih tinggi. Kedelai hitam di Cina digunakan sebagai bahan obat karena kedelai hitam dilaporkan dapat menghambat oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan mempunyai kadar antioksidan total lebih tinggi daripada jenis kedelai lainnya (Shih, *et al.*, 2002). Dengan kandungan flavonoid yang tinggi tersebut, kedelai hitam dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber fitoestrogen dari luar tubuh yang berpengaruh terhadap sistem reproduksi betina.

Salah satu organ reproduksi betina yang dapat dipengaruhi oleh fitoestrogen adalah ovarium. Ovarium berfungsi sebagai penghasil sel telur dan menghasilkan hormon reproduksi yaitu estrogen dan progesteron. Estrogen berperan dalam merangsang perkembangan kelenjar mammae, merangsang siklus estrus dan persiapan uterus untuk implantasi. Sedangkan progesteron berperan dalam mengatur siklus menstruasi (Hafez dan Hafez, 2000).

Produksi estrogen dapat berkurang akibat menopause dan ovariectomi. Penurunan kadar estrogen dalam tubuh menyebabkan perubahan fisiologis pada sistem reproduksi betina (Cassidy *et al.*, 1995). Oleh sebab itu, diperlukan asupan hormon estrogen dari luar tubuh, dalam hal ini fitoestrogen dari kacang-kacangan dapat dimanfaatkan untuk menggantikan peran estrogen endogen. Mekanisme kerja fitoestrogen dalam jaringan adalah dengan berikatan pada reseptor estrogen (Markaverich *et al.*, 1995).

Hasil penelitian Mardianti dan Sitasiwi (2008) pada mencit yang diberi ekstrak tepung kedelai dosis 0,975 mg/mencit/hari selama 40 hari mengalami peningkatan jumlah folikel. Safrida (2008) menyatakan bahwa pemberian tepung kedelai dan tepung tempe dengan dosis 10 g/100g BB/hari selama 28 hari pada tikus meningkatkan hormon estrogen sehingga fase proestrus dan estrus menjadi lebih panjang. Menurut Suprihatin (2008), pemberian isoflavon dari tepung tempe dan tepung kedelai dengan dosis 5 g/100g BB/hari selama 28 hari pada tikus yang dapat meningkatkan proliferasi sel granulosa folikel ovarium sehingga sel-sel folikel lebih cepat mengalami pematangan dan mencegah terjadinya atresi. Pemberian fitoestrogen dari parutan bengkuang pada dosis 0,6g/kg, dan 0,9g/kg selama 24 hari mampu meningkatkan proliferasi sel-sel folikel sekunder dan folikel tersier pada mencit premenopause (Primiani, 2015). Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,63 g/ml/hari pada mencit ovariectomi unilateral meningkatkan jumlah kelenjar endometrium, tebal endometrium, dan tebal miometrium jika dibandingkan dengan kontrol (Ulfa, 2017). Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak kedelai hitam terhadap histologi ovarium mencit ovariectomi unilateral.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

Apakah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam meningkatkan jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf pada mencit ovariectomi unilateral?

1.3 Batasan masalah

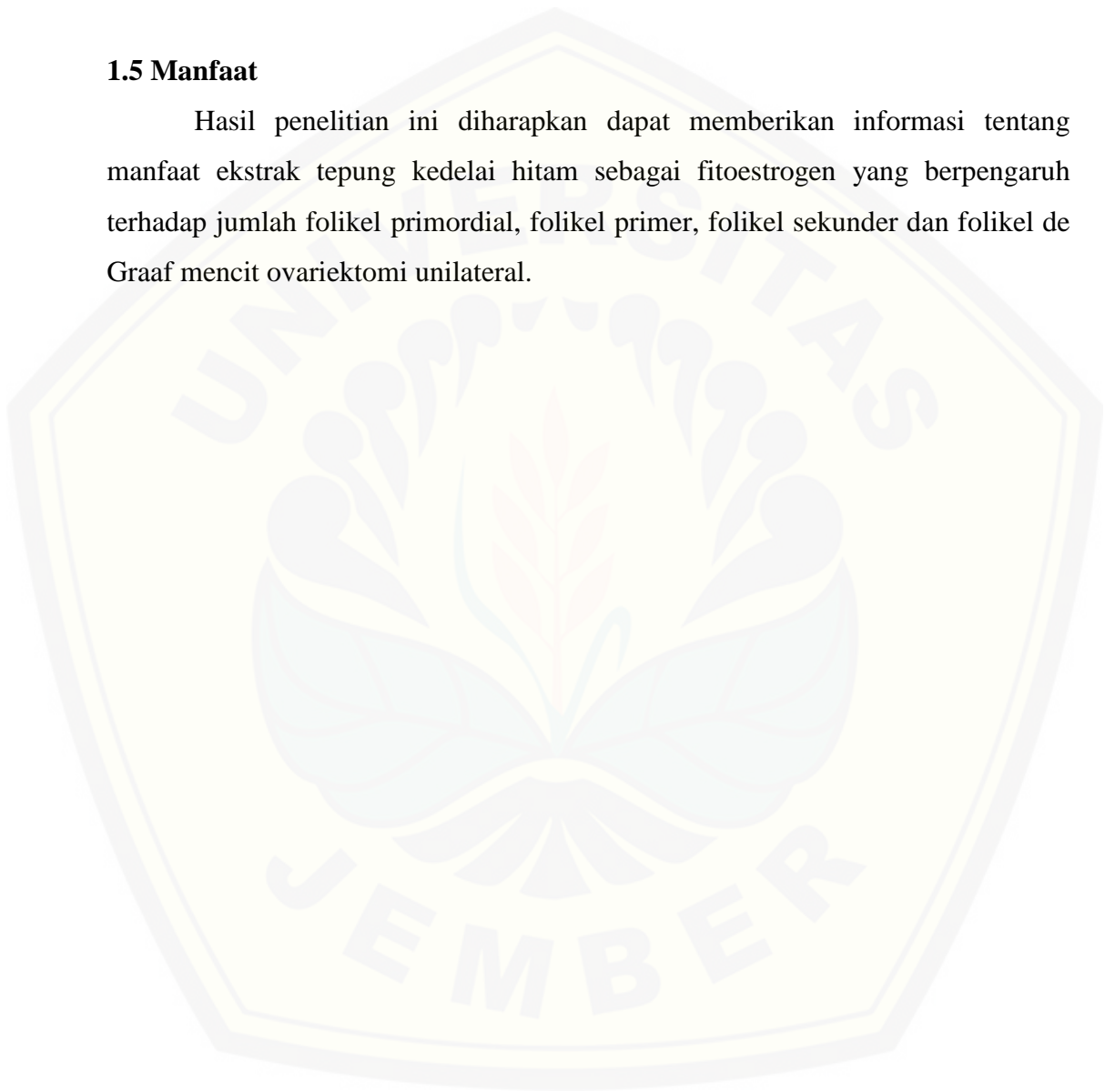
Batasan masalah pada penelitian ini adalah perlakuan ovariectomi unilateral dengan masa defisiensi estrogen selama 60 hari.

1.4 Tujuan

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tepung kedelai hitam terhadap jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf pada mencit ovariektomi unilateral.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang manfaat ekstrak tepung kedelai hitam sebagai fitoestrogen yang berpengaruh terhadap jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf mencit ovariektomi unilateral.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Histologi dan Perkembangan Folikel Ovarium

Ovarium merupakan organ yang berfungsi untuk menghasilkan hormon dan sel gamet. Struktur histologi ovarium yaitu permukaan ovarium dilapisi sel epitel kuboid. Menurut Junqueira *et al.* (1998), histologi ovarium terdiri atas dua daerah, yaitu: daerah korteks dan daerah medulla seperti terlihat pada Gambar 2.1. Pada korteks ditemukan banyak folikel yang terdiri atas folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf. Medulla tersusun dari jaringan ikat longgar dan pembuluh darah (Manohey, 1983).



Gambar 2.1 Struktur Histologi Ovarium (Junqueira *et al.*, 1998)

Perkembangan folikel ovarium adalah terjadi penambahan ukuran oosit, adanya perubahan bentuk sel granulosa yang mengelilinginya, dari bentuk pipih menjadi kuboid, ada peningkatan jumlah sel granulosa, dan terdapat zona pelusida di sekitar oosit (Heffner & Schust, 2008).

Proses perkembangan folikel diawali dengan perekrutan folikel primordial. Secara histologis, folikel primordial terdiri atas satu oosit primer yang dilindungi oleh satu lapis sel folikel berbentuk pipih (Tortora dan Derrickson, 2014). Proses pertumbuhan folikel, ovulasi, dan pembentukan CL sangat dipengaruhi oleh sirkulasi hormon reproduksi dalam tubuh.

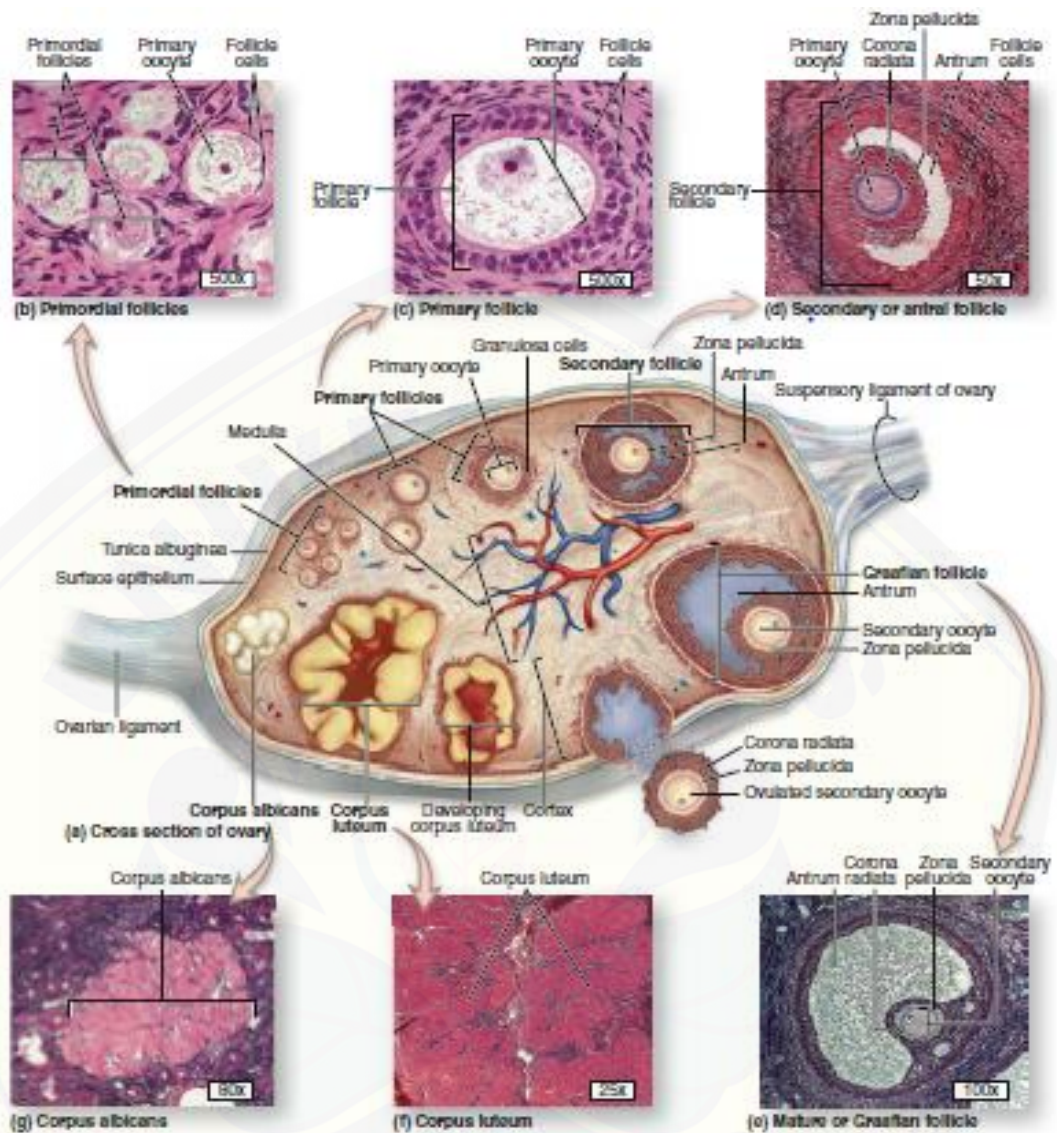
Fase folikular dimulai dengan penghilangan efek negatif dari progesteron sehingga konsentrasi GnRH meningkat. Peningkatan konsentrasi GnRH akan menyebabkan peningkatan produksi FSH dan LH sehingga dapat mendukung pertumbuhan folikel. Folikel de Graaf akan menghasilkan lebih banyak estrogen. Jika estrogen telah mencapai kadar maksimal, maka akan memicu pengeluaran LH sehingga terjadi ovulasi. Pada fase luteal, konsentrasi LH tidak dapat mencapai kadar maksimal, akan mengalami penurunan sekresi estrogen dan inhibin menyebabkan terbentuknya gelombang folikel baru. Folikel dominan yang mengandung estrogen dan inhibin dengan konsentrasi tinggi berhubungan dengan penekanan konsentrasi FSH dalam sirkulasi darah (Maidaswar, 2007). Penyebab tidak terjadinya ovulasi menurut Senger (2003) karena kadar progesteron masih dominan, kondisi hormonal yang sesuai untuk perkembangan akhir folikel akan nyata setelah luteolisis (tanpa CL) dan menurun kadar progesteron. Lisisnya CL diakibatkan oleh kerja $\text{PGF2}\alpha$, dengan mekanisme alaminya diawali oleh sekresi oksitosin oleh CL dengan reseptor sudah terbentuk pada dinding uterus. Respons selanjutnya uterus mensekresikan $\text{PGF2}\alpha$ ke dalam pembuluh darah sampai mencapai reseptornya di sel luteal CL.

Folikel primer terdiri atas oosit dengan posisi berada ditengah dan dikelilingi oleh sel-sel hasil pembelahan sebelumnya. Sel-sel tersebut merupakan lapisan sel yang disebut sel granulosa. Ciri folikel primer adalah sel granulosa berbentuk kubus unilaminar dan multilaminar serta belum terbentuk antrum. Folikel primer terletak dekat atau menempel pada permukaan ovarium dan oositnya tidak terbungkus oleh membran (zona pelusida) (Nalbandov, 1990). Pada folikel sekunder, lapisan sel-sel folikel membelah membentuk lapisan sel granulosa. Folikel mengalami pertumbuhan, antrum mulai terbentuk dan oosit

sudah dilengkapi membran (zona pelusida) (Nalbandov, 1990). Folikel sekunder memiliki ukuran yang lebih besar daripada folikel primer, hal ini dikarenakan oleh jumlah sel-sel granulosanya yang lebih banyak. Pada tahap ini, folikel menjauhi korteks menuju medulla ovarium.

Folikel de Graaf adalah bentuk folikel yang telah matang pada ovarium. Pada tahap ini, antrum membesar sampai mencapai seluruh ketebalan korteks ovarium dan terbentuk kumulus ooforus, sehingga folikel de Graaf tampak sebagai folikel yang terbesar dan siap untuk ovulasi (Nalbandov, 1990). Pada saat folikel telah mencapai kematangan, peningkatan hormon estrogen akan memberikan umpan balik positif kepada hipofisis anterior untuk mensekresikan LH dan umpan balik negatif kepada hipofisis anterior untuk menghambat disekresikannya FSH. LH menginduksi terjadinya ovulasi berupa perubahan pada struktur dan biokimia dari dinding folikel yang mengakibatkan pecahnya dan pengeluaran oosit dari dalam folikel yang dikelilingi oleh kumulus ooforus (Sherwood, 2010).

Pasca ovulasi, dinding folikel menyusut membentuk korpus luteum. Korpus luteum adalah massa jaringan kuning di dalam ovarium yang dibentuk oleh sebuah folikel yang telah matang dan mengeluarkan ovum. Korpus luteum akan menghasilkan hormon progesteron yang berguna untuk mengatur siklus menstruasi, mengembangkan jaringan glandula mammae dan menyiapkan uterus pada waktu kelahiran. Korpus luteum akan berhenti memproduksi progesteron dan berkembang menjadi korpus albikan pada saat ovum tidak dibuahi. Pada saat ini, lapisan endometrium akan meluruh keluar dari uterus. Perkembangan folikel ovarium dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Perkembangan folikel ovarium (Junqueira *et al.*, 1998)

2.2 Komposisi Senyawa Kimia pada Biji Kedelai Hitam dan Pengaruhnya pada Organ Reproduksi

Tanaman kedelai hitam termasuk famili *Leguminosae*. Meski memiliki kandungan protein lebih rendah dibandingkan dengan kedelai kuning, kedelai hitam juga merupakan sumber protein nabati. Rata-rata kandungan protein biji kedelai hitam 37 persen dengan kandungan asam amino terbanyak adalah tirosin. Kedelai hitam antara lain digunakan sebagai bahan pembuat kecap. Kedelai hitam mempunyai kandungan fenolik, tanin, antosianin dan isoflavon serta aktivitas

antioksidan lebih tinggi dibanding kedelai kuning (Xu dan Chang, 2007). Menurut Xu dan Chang (2007) kedelai hitam memiliki kandungan flavonoid 6 kali lebih banyak dibanding kedelai kuning. Kandungan total flavonoid kedelai hitam dan kuning berturut-turut 2,57 dan 0,41 mg. Kedelai hitam memiliki aktivitas antioksidan 15 kali lebih tinggi daripada kedelai kuning.

Menurut Astadi *et al.* (2009) kulit kedelai hitam varietas Mallika memiliki kandungan antosianin 1,36 g/100 g dan senyawa fenolik 6,46 g/100 g. Isoflavon yang bersifat estrogenik terdapat pada kotiledon biji kedelai, sedangkan antosianin terdapat pada kulit kedelai. Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman tetapi tidak disintesis oleh mikroorganisme. Beberapa bentuk isoflavon pada biji kedelai adalah glikosida yang meliputi daidzin, genistin dan glisitin. Genestin dan daidzein merupakan fitoestrogen yang mempunyai sifat estrogenik dan antiestrogenik, yang dapat berperan sebagai estrogen eksogen (Nurrahman, 2015). Struktur kimia isoflavon mirip dengan hormon estrogen sehingga isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen.

Hasil penelitian Mardianti dan Sitaswi (2008) pada mencit yang diberi ekstrak tepung kedelai dosis 0,975 g selama 40 hari mengalami peningkatan jumlah folikel. Hal ini terjadi karena ada kandungan fitoestrogen pada ekstrak tepung kedelai. Penelitian lain yang dilakukan oleh Suprihatin, (2008) menunjukkan bahwa pemberian isoflavon dari tepung tempe dan tepung kedelai dengan dosis 5 g/100g BB/hari selama 28 hari pada tikus dapat meningkatkan proliferasi sel granulosa pada folikel ovarium sehingga sel-sel folikel lebih cepat mengalami pematangan dan mencegah terjadinya atresi. Pada penelitian Primiani (2015) pemberian fitoestrogen dari ekstrak parutan bengkoang dengan dosis 0,6 g/kg dan 0,9 g/kg selama 24 hari mampu meningkatkan proliferasi folikel pada mencit premenopause. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada dosis 0,63 g/ml/hari pada mencit ovariectomi unilateral dapat meningkatkan jumlah kelenjar endometrium, tebal endometrium, dan tebal miometrium jika dibandingkan dengan kontrol (Ulfa, 2017).

2.3 Hipotesis

Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam meningkatkan jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf pada ovarium mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi unilateral.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pembuatan preparat histologi ovarium dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2016 sampai Desember 2016.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari kandang mencit ukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dari plastik dan penutup dari ram kawat besi, timbangan analitik 200 x 0,1 gram, jarum sonde lambung ujung tumpul 20 gauge 5 cm, botol minum mencit, papan bedah, *sput injection* 1cc/ml, silet, ekskavator, *paratus case*, jarum sutura nomor 2, klem arteri, *Needle holder*, pinset anatomi, pinset sirugis, gunting *metzenbaum*, gunting balutan, gunting runcing, *beaker glass* 500ml, *beaker glass* 250 ml, gelas ukur 100 ml, botol *scott* 1000 ml, corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen 75cc, saringan tepung 70 mesh, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki *stainless steel*, baki plastik, sendok plastik, cup ekstrak kecil, *rotary microtome*, oven, botol reagen, mikroskop (*Olympus*), optilab, *staining jar*, flakon, oven (*Incucell*), skalpel, dan *hot plate*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri atas mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta, pakan pellet Turbo, aquades steril, ketamine 10%, *xyla*, benang silk nomor 3, benang *catgut* nomor 3, sekam padi steril, serbuk gergaji kayu steril, *betadine*, alkohol 70%, antibiotik (*Levofloxacin*), cairan infus 0,9% 'Sodium Chloride', kasa steril, *tissue*, *gloves*,

masker, kedelai hitam, kertas saring, kain saring, gelas objek, gelas penutup, *chloroform*, larutan fiksatif PBS formalin, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut, pewarna Hematoxylin dan Eosin (HE), xylol, dan entelan.

3.3 Rancangan Penelitian

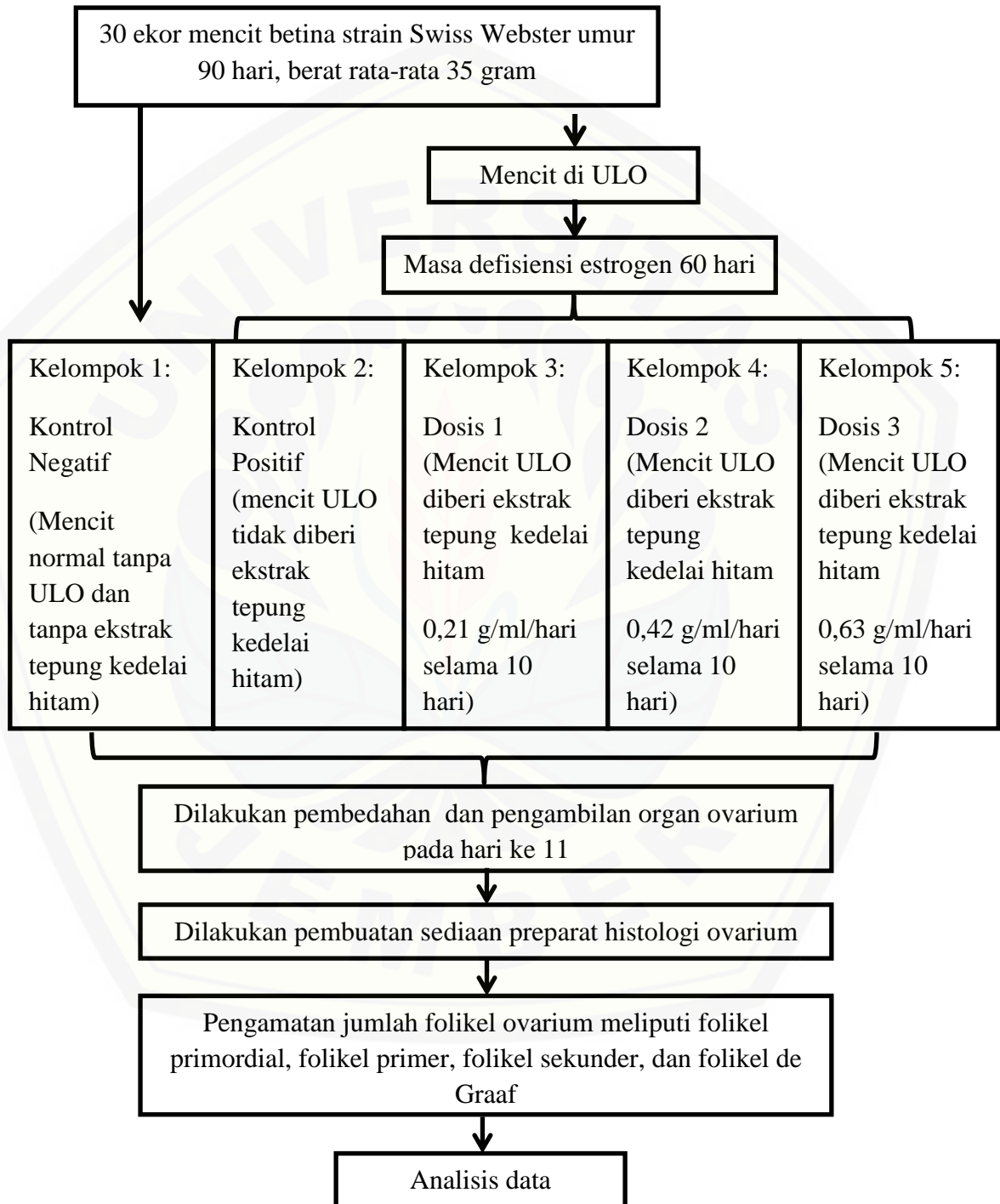
Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang bertujuan untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok uji yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Variabel bebas pada perlakuan ini adalah dosis pemberian ekstrak kedelai hitam selama 10 hari. Variabel terikatnya adalah jumlah folikel ovarium mencit pasca ovariektomi.

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster umur 90 hari dengan berat 35 gram yang di ovariektomi unilateral. Mencit siap digunakan sebagai hewan uji setelah masa defisiensi estrogen 60 hari. Mencit tersebut dibagi menjadi lima kelompok dengan tiga pengulangan sebagai berikut:

- Kelompok 1 : Kelompok kontrol negatif mencit tanpa ovariektomi unilateral dan tidak diberi ekstrak tepung kedelai hitam.
- Kelompok 2 : Kelompok kontrol positif mencit ovariektomi unilateral dan tidak diberi ekstrak tepung tempe kedelai hitam.
- Kelompok 3 : Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,21 g/ml/hari selama 10 hari.
- Kelompok 4 : Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,42 g/ml/hari selama 10 hari.
- Kelompok 5 : Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,63 g/ml/hari selama 10 hari.

3.4 Alur penelitian

Secara keseluruhan rangkaian kegiatan penelitian berupa alur penelitian yang tampak pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur kegiatan penelitian

3.5 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu: persiapan hewan uji, pembuatan ekstrak tepung kedelai hitam, pembuatan hewan uji ovariektomi, tahap pengambilan sampel preparat histologi ovarium, dan tahap pengamatan.

3.5.1 Persiapan Hewan uji

Hewan yang digunakan pada penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster umur 90 hari dengan berat badan 35 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta, diovariektomi dan diadaptasikan dalam kandang selama 60 hari masa defisiensi estrogen. Mencit ditempatkan dalam kandang berukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dengan alas sekam padi dan serbuk gergaji kayu steril dengan tutup kawat. Mencit diberi pakan standar berupa pellet Turbo dengan pemberian 1/10 dari berat badan mencit dan minum aquades steril secara *ad libitum* serta ditempatkan pada ruangan dengan suhu ruang 27°C dengan kelembaban relatif 77%.

3.5.2 Ovariektomi mencit

Ovariektomi adalah pengambilan ovarium melalui pembedahan. Prosedur ovariektomi dilakukan pada mencit betina berusia 90 hari yang dibius dengan ketamil 10% dan xyla dengan perbandingan 1:1 dengan dosis 0,05 ml secara intramuskular. Mencit diletakkan terlentang pada papan bedah dan diolesi dengan air sabun antibakteri serta *betadine* pada bagian medial perut, dilakukan pencukuran rambut pada bagian medial perut dengan menggunakan silet.

Selanjutnya dilakukan pembedahan secara perlahan hingga lapisan muskulus daerah abdomen terbuka, dilakukan penyayatan dengan menggunakan gunting ujung tumpul dan pinset pada kulit bagian luar dengan lebar 1,5 cm dan kulit bagian dalam 1 cm. Semua bagian organ reproduksinya diambil untuk mencari ovarium kanan kemudian dijepit dengan klem arteri dan diikat bagian ujung oviduk dengan silk, ovarium dipotong secara perlahan dengan gunting *matzenbaum* dan arteri klem arteri dilepas. Organ yang telah dikeluarkan

direposisi kembali dalam abdomen dan diberi 0,5 ml larutan *Sodium Chloride* 0,9 %.

Proses penutupan dilakukan pada bagian *muskulus oblikus abdominis internus* dengan cara dijahit menggunakan *cut gut chromic* ukuran 3.0 sedangkan untuk menjahit *muskulus oblikus abdominis eksternus* dan kulit digunakan benang silk ukuran 3,0 dan jarum sutura. Luka akibat pembedahan diolesi dengan betadin pada daerah insisi. Dilakukan injeksi antibiotik (*Levofloxacin*) pada mencit dengan dosis 0,05 ml serta paracetamol 1 sendok teh/200 ml aquades selama 1 minggu.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Tepung Kedelai Hitam

Biji kedelai hitam ditumbuk kemudian ditimbang dan dioven pada suhu 44-46°C selama tiga hari kemudian digiling dengan menggunakan grinder hingga menjadi tepung, dilakukan pengayakan 70 mesh agar mendapatkan tekstur yang halus. Tepung kedelai hitam yang diperoleh dari pengayakan diberi pelarut alkohol 70% perbandingan 1:4. Larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer electric* dengan kecepatan 500 rpm dan dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat murni tanpa alkohol, kemudian filtrat dimasukkan dalam *waterbath* selama ± 8 jam untuk mendapatkan filtrat murni dalam bentuk pasta.

3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit betina strain Swiss Webster yang telah diovariectomi unilateral dan dipelihara selama 60 hari untuk masa defisiensi estrogen. Mencit kemudian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ekstrak tepung kedelai hitam. Kelompok kontrol terdiri atas kontrol negatif yaitu mencit tanpa ovariectomi unilateral dan tanpa ekstrak tepung kedelai hitam dan kontrol negatif yaitu mencit ovariectomi unilateral tanpa ekstrak tepung kedelai hitam. Sedangkan kelompok perlakuan yaitu mencit ovariectomi unilateral diberi ekstrak tepung kedelai hitam

secara oral (*gavage*) dengan dosis 0,21 g/ml/hari, 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari selama 10 hari. Penentuan dosis dapat dilihat pada Lampiran A. Kemudian mencit dibedah pada hari ke-11 serta pengambilan organ ovarium, dilanjutkan dengan pembuatan preparat ovarium sehingga dapat diamati, pengamatan meliputi jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel de Graaf. Hasil yang diperoleh tersebut kemudian dianalisis menggunakan aplikasi SPSS.

3.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

Pengambilan sampel dilakukan dengan pembedahan pada bagian medial perut untuk mengambil organ ovarium. Selanjutnya metode yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi ovarium dengan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Metode parafin dilakukan dengan urutan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *infiltrasi*, *embedding*, *sectioning*, *affixing* dan *mounting*. Prosedur pembuatan preparat histologi ovarium:

a. Fiksasi, Dehidrasi dan *Clearing*

Organ ovarium yang telah diambil dicuci dengan NaCl 0,9% dimasukkan dalam flakon berisi larutan fiksatif BPS formalin selama 3 jam kemudian dicuci alkohol 70%. Proses dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 70%, 80% dan 95% masing-masing 1,5 jam. Selanjutnya digunakan alkohol absolut dan xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1 dan 1:3 selama 30 menit. Proses selanjutnya adalah *clearing*, organ ovarium dijernihkan dengan xylol selama 4-6 jam.

b. Infiltrasi dan *Embedding* (penanaman)

Sebelum melakukan penanaman dilakukan infiltrasi parafin dengan menggunakan parafin yang telah dicairkan di dalam oven, kemudian infiltrasi dilakukan secara bertingkat menggunakan parafin I,II selama ½ - 1 jam. Infiltrasi parafin dilakukan pada suhu 56-58°C. Setelah infiltrasi kemudian dilakukan penanaman organ pada blok parafin yang telah dicairkan dengan cepat sebelum parafin menjadi beku kembali.

c. Penyayatan (*Sectioning*) dan perekatan (*Affixing*)

Organ yang akan disayat direkatkan pada holder dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Organ ovarium disayat melintang menggunakan rotary microtome dengan ketebalan 8 μm -10 μm . Sayatan direkatkan (*affixing*) pada gelas objek yang telah dilapisi perekat gliserin dan albumin, kemudian disimpan dalam inkubator 4°C selama 24 jam, sedian diwarnai dengan *Haematoxylin* dan *Eosin*.

d. Pewarnaan (*Staining*)

Preparat ovarium yang akan dilakukan pewarnaan terlebih dahulu deparafinisasi menggunakan xylol I dan II masing-masing 15-30 menit. Kemudian dilakukan hidrasi bertingkat mulai dari absolut, 95%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan aquades masing-masing 2 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *Haematoxylin* selama 2-3 menit, kemudian dicuci air mengalir. Dimasukkan kembali dalam alkohol bertingkat dari 20% hingga 70%. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Eosin selama 10 menit dilanjutkan alkohol bertingkat hingga Xylol I dan II selama 2 menit.

e. Penutupan (*Mounting*)

Irisan diberi entellan terlebih dahulu kemudian ditutup dengan *cover glass*, dikeringkan diatas *hot plate* agar terbebas dari gelembung udara dan dapat diamati pada mikroskop.

3.6 Parameter yang diamati

Parameter yang diamati adalah jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf sebanyak tiga kali pengulangan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan optilab.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 99 % atau $\alpha = 0,01$ untuk mengetahui pengaruh dosis, dilanjutkan dengan Uji Duncan untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan (Steel and Torrie, 1993).

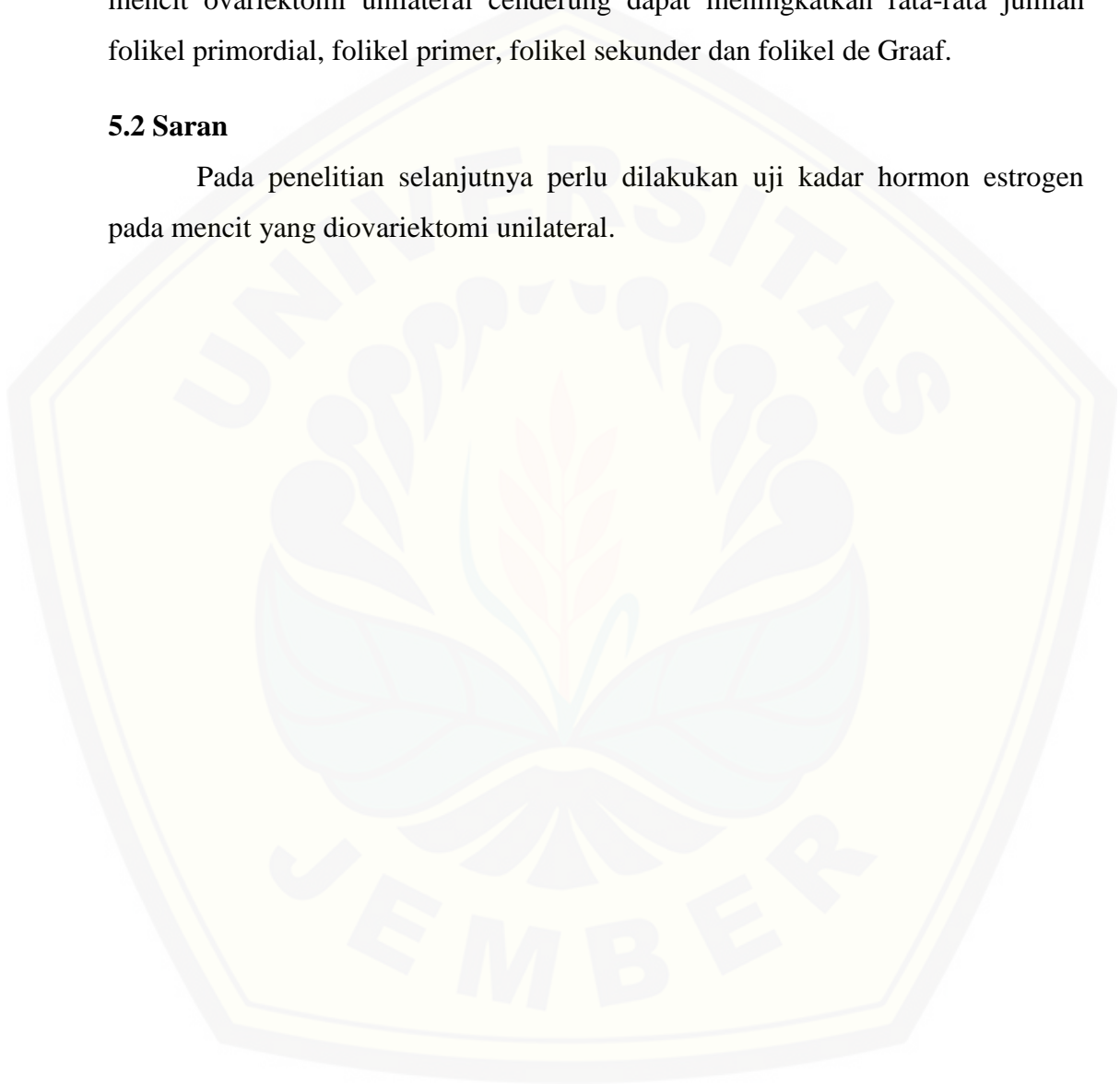
BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian ekstrak tepung kedelai hitam pada mencit ovariektomi unilateral cenderung dapat meningkatkan rata-rata jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel de Graaf.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji kadar hormon estrogen pada mencit yang diovariektomi unilateral.



DAFTAR PUSTAKA

- Astadi, I.R., M. Astuti, U. Santoso and P.S. Nugraheni. 2009. In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem.*, 122: 659-663.
- Berkalani, Yeni Kazia. 2013. Pengaruh Pemberian Infusa Biji Adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Produktif Dan Premenopause. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Cassidy, A., Bingham, S., and Setchell, K. 1995. Biological Effects of Isoflavones In Young Women: Importance of The Chemical Composition of Soybean Products. *British Journal of Nutrition*. 74: 587-601.
- Dewantiningrum, J. 2008. Perbedaan Pengaruh Clomiphene Citrate dan Letozole Terhadap Folikel, Endometrium dan Lendir Serviks. *Tesis*. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis I Universitas Diponegoro.
- Dickey RO, Olar TT, Taylor SN, Curole DN, Matulich EM. Relationship of endometrial thickness and pattern to fecundity in ovulation induction cycles :effect of clomiphene citrate alone and with human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril* 1993;59:756-60
- Harrison, R. M., Phillippi, P. P., Swan, K. F., dan Henson, M. C. 1999. Effect of Genistein on Steroid Hormone Production in the Pregnant Rhesus Monkey. *Experimental Biology and Medicine*. 222(1): 78-84.
- Hafez, B. dan Hafez, E. 2000. *Reproduction in Farm Animal 7th Edition*. USA. Lippincott William & Wilkins : Baltimore.
- Heffner, L., Schust, D. 2008. *Sistem Reproduksi*. Surabaya; Erlangga. Hal:38-40.
- Herbrandson C. 2005. Learning The Reproductive System Chapter 28. *Online at <http://academic.kellogg.edu/>*
- Junquiera, L. C., Camiero, J. Dan Kelley, R. G. 1998. *Histologi Dasar Edisi 8* (alih bahasa Jan Tambayong). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Maidaswar. 2007. Efisiensi Superovulasi pada Sapi Melalui Sinkronisasi Gelombang Folikel dan Ovulasi. *Tesis*. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mardianti, S. M.dan Sitasiwi, A. J. 2008. *Korelasi Jumlah Folikel Ovarium dengan Konsentrasi Hormon Estrogen Mencit (Mus musculus) setelah*

- Konsumsi Harian Tepung Kedelai selama 40 Hari.* Buletin Anatomi dan Fisiologi Volume XVI, Nomor 2, Oktober.
- Markaverich, B.M., B. Webb, C.L. Densmore dan R.R. Gregory, 1995. *Effect of Coumestrol on Estrogen Reseptor Function and Uterin Growth in Ovarietomized Rats.* J. Environ. Health.
- Mazur, W. M., J. A. Duke, K. Wahala, S. Rasku, dan H. Adlercretutz. 1998. *Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritiol and Health Aspect in Humans.* *Research Communications.* 9: 193-200.
- Meredith, S., G., Dudenhorffer, R. L. Butcher, S. P. Lener, dan T. Walls. 1992. *Unilateral Ovariectomy Increases Loss of Primordial Follicles and is Associated with Increased Metestrus Concentration of Follicles Stimulating Hormone in Old Rats.* *Biology of Reproduction.* 47: 162-168.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas*, Cetakan Pertama. Jakarta : Universitas Indonesia (UI-Press).
- Nurrahman, N., 2015. *Evaluasi Komposisi Zat Gizi dan Senyawa Antioksidan Kedelai Hitam dan Kedelai Kuning.* *Aplikasi Teknologi Pangan*, 4(3).
- Primiani, C. N. 2015. *The Phtoestrogenic Potential of Yam Bean (Pachyrhizus erosus) on Ovarian and Uterine Tissue Structure of Premenopauseal Mice.* *Biology, Medicine, and Natural Product Chemistry.* 4(1): 4-9.
- Reinli & Block, 1996. *Phytoestrogen content of food a compendium of literature values.* *Nurt Cancer.* Public Health nutrition Program, University of California at Berkeley 94720. USA.
- Rul, A. S., S. K. Soejono, E. Meiyanto, dan M. S. H. Wahyuningsih. 2016. *Efek Kurkumin Terhadap Estradiol dan Ekspresi Reseptor Estrogen β Kultur Sel Granulosa Babi Folikel Sedang.* *Jurnal Kedokteran Brawijaya.* 29(1): 32-38.
- Safrida. 2008. *Perubahan Kadar Hormon Estrogen Pada Tikus yang diberi Tepung Kedelai dan Tepung Tempe* [Tesis] Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut pertanian Bogor.
- Senger, P.L. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition.* 2nd revision edition. Washington State University Research & Technology Park. Current Conceptions Inc., Washington. Halaman : 210–230.
- Sherwood, L. 2010. *Fisiologi Manusia: Dari Sel ke Sistem* Edisi 6. Jakarta: EGC.

- Shih, M.C., Yang K.T and Kuo S.J. 2002. Quality and Antioxidative Activity of Black soybeans Tofu as Affected by Bean Cultivar. *Journal of Food Sci.* vol 67 (2).
- Speroff L. dan Fritz M.A. 2005. *Regulation on The Menstrual Cycle*. In Clinical Gynecologic, Endocrinology and Infertility. 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and wilkins. p. 187-233
- Steel, R., Torrie J. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Sumantri, B. Penerjemah. Jakarta : Gramedia Pustaka. Terjemahan dari *Principles and Procedures oStatistics*.
- Suprihatin. 2008. Optimalisasi Kinerja Reproduksi Tikus Betina Setelah Pemberian Tepung Kedelai dan Tepung Tempe pada Usia Prapubertas. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Tortora, G. J. dan B. Derrickson. 2014. *Principles of Anatomy and Physiology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Ulfa, Yurinda M. 2016. Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (Glycine soya) terhadap Struktur Histologi Uterus Mencit (Mus musculus) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Whitten, Patricia L., and Pattisaul, H.B. 2001. *Cross-species dan interassay Comparison of Phytoestrogen Action*. *Environmental Health Perspectives Supplements*. Volume 109. Departemen Anthropology and Center for Behavioural Neuroscience Emory University. Atlanta. Georgia USA.
- Xu, B.J. and S.K.S. Chang. 2007. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant of legums as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.*,72(2):159-166.

LAMPIRAN

A. Penentuan Dosis

- Penentuan dosis dihitung berdasarkan penelitian Safrida (2008), yaitu 10g berat kering (BK)/100gram berat badan (BB) tikus.
- Konfersi pasta dari berat kering tepung kedelai.

| Berat Kering Tepung : | Berat Pasta |
|-----------------------|-------------|
| 2034,8 g | : 175,6 g |
| 1 g | : 0,086 g |

10 g BK / 100 g BB tikus

$$\frac{10 \text{ g BK}}{100 \text{ g BB}} = 0,1 \text{ g BK / g BB tikus}$$

- Rata – rata BB tikus = 200 g
 $0,1 \times 200 = 20 \text{ g Bk / 200 g BB mencit}$
- Konfersi 200 g tikus → 20 g BB mencit = 0,14.
 $20 \times 0,14 = 2,8 \text{ g}$
- Dikonfersikan ke pasta
 $2,8 \times 0,086 = 0,24 \text{ g pasta / g BB mencit}$
 $\frac{0,24}{20} = 0,12 \text{ g pasta / g BB mencit}$
- Rata – rata BB mencit perlakuan = 35 g.
 $0,12 \times 35 = 0,42 \text{ g}$
- Penentuan dosis diambil dari acuan yaitu 0,42 g (Dosis 2), setengah lebih rendah = 0,21 g (Dosis 1) dan setengah lebih tinggi = 0,63 g (Dosis 3)

A. Hasil Analisis *Oneway* ANOVA dan Uji Duncan Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Folikel Primordial, Jumlah Folikel Primer, Jumlah Folikel Sekunder dan Jumlah Folikel Graaf.

Analisis *One Way* ANOVA dan Uji Duncan 10 hari

Tests of Normality

| | perlakuan | Kolmogorov-Smirnov(a) | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------------|-----------------|-----------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| folikel_primordial | kontrol negatif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | kontrol positif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | dosis 1 | ,219 | 3 | . | ,987 | 3 | ,780 |
| | dosis 2 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | dosis 3 | ,292 | 3 | . | ,923 | 3 | ,463 |
| folikel_primer | kontrol negatif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | kontrol positif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | dosis 1 | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | dosis 2 | ,314 | 3 | . | ,893 | 3 | ,363 |
| | dosis 3 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| folikel_sekunder | kontrol negatif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | kontrol positif | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | dosis 1 | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | dosis 2 | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | dosis 3 | ,191 | 3 | . | ,997 | 3 | ,900 |
| folikel_de_graaf | kontrol negatif | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | kontrol positif | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | dosis 1 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |
| | dosis 2 | ,253 | 3 | . | ,964 | 3 | ,637 |
| | dosis 3 | ,175 | 3 | . | 1,000 | 3 | 1,000 |

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--------------------|-----------------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| folikel_primordial | kontrol negatif | 3 | 15,0000 | 1,00000 | ,57735 | 12,5159 | 17,4841 | 14,00 | 16,00 |
| | kontrol positif | 3 | 7,0000 | 1,00000 | ,57735 | 4,5159 | 9,4841 | 6,00 | 8,00 |
| | dosis 1 | 3 | 10,3333 | 2,51661 | 1,45297 | 4,0817 | 16,5849 | 8,00 | 13,00 |
| | dosis 2 | 3 | 14,0000 | 1,00000 | ,57735 | 11,5159 | 16,4841 | 13,00 | 15,00 |
| | dosis 3 | 3 | 17,3333 | 2,08167 | 1,20185 | 12,1622 | 22,5045 | 15,00 | 19,00 |
| | Total | 15 | 12,7333 | 4,02611 | 1,03954 | 10,5038 | 14,9629 | 6,00 | 19,00 |
| folikelprimer | kontrol negatif | 3 | 15,0000 | 1,00000 | ,57735 | 12,5159 | 17,4841 | 14,00 | 16,00 |
| | kontrol positif | 3 | 4,0000 | 1,00000 | ,57735 | 1,5159 | 6,4841 | 3,00 | 5,00 |
| | dosis 1 | 3 | 6,6667 | 1,52753 | ,88192 | 2,8721 | 10,4612 | 5,00 | 8,00 |
| | dosis 2 | 3 | 10,0000 | 2,64575 | 1,52753 | 3,4276 | 16,5724 | 8,00 | 13,00 |
| | dosis 3 | 3 | 15,0000 | 3,00000 | 1,73205 | 7,5476 | 22,4524 | 12,00 | 18,00 |
| | Total | 15 | 10,1333 | 4,86778 | 1,25685 | 7,4376 | 12,8290 | 3,00 | 18,00 |
| folikelsekunder | kontrol negatif | 3 | 5,0000 | 1,00000 | ,57735 | 2,5159 | 7,4841 | 4,00 | 6,00 |
| | kontrol positif | 3 | 1,0000 | 1,00000 | ,57735 | -1,4841 | 3,4841 | ,00 | 2,00 |
| | dosis 1 | 3 | 1,8333 | ,76376 | ,44096 | -,0640 | 3,7306 | 1,00 | 2,50 |
| | dosis 2 | 3 | 1,8333 | ,76376 | ,44096 | -,0640 | 3,7306 | 1,00 | 2,50 |
| | dosis 3 | 3 | 5,1667 | 2,75379 | 1,58990 | -1,6741 | 12,0074 | 2,50 | 8,00 |
| | Total | 15 | 2,9667 | 2,19957 | ,56793 | 1,7486 | 4,1847 | ,00 | 8,00 |
| folikeldegraaf | kontrol negatif | 3 | 2,6667 | ,76376 | ,44096 | ,7694 | 4,5640 | 2,00 | 3,50 |
| | kontrol positif | 3 | ,8333 | ,76376 | ,44096 | -1,0640 | 2,7306 | ,00 | 1,50 |
| | dosis 1 | 3 | 1,0000 | ,50000 | ,28868 | -,2421 | 2,2421 | ,50 | 1,50 |
| | dosis 2 | 3 | 1,1667 | ,76376 | ,44096 | -,7306 | 3,0640 | ,50 | 2,00 |
| | dosis 3 | 3 | 2,0000 | ,50000 | ,28868 | ,7579 | 3,2421 | 1,50 | 2,50 |
| | Total | 15 | 1,5333 | ,91548 | ,23637 | 1,0264 | 2,0403 | ,00 | 3,50 |

ANOVA

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|--------------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| folikel_primordial | Between Groups | 199,600 | 4 | 49,900 | 18,256 | ,000 |
| | Within Groups | 27,333 | 10 | 2,733 | | |
| | Total | 226,933 | 14 | | | |
| folikel_primer | Between Groups | 291,067 | 4 | 72,767 | 17,893 | ,000 |
| | Within Groups | 40,667 | 10 | 4,067 | | |
| | Total | 331,733 | 14 | | | |
| folikel_sekunder | Between Groups | 46,233 | 4 | 11,558 | 5,376 | ,014 |
| | Within Groups | 21,500 | 10 | 2,150 | | |
| | Total | 67,733 | 14 | | | |
| folikel_de_graaf | Between Groups | 7,233 | 4 | 1,808 | 4,019 | ,034 |
| | Within Groups | 4,500 | 10 | ,450 | | |
| | Total | 11,733 | 14 | | | |

folikel_primordial

Duncan

| perlakuan | N | Subset for alpha = .01 | | |
|-----------------|---|------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| kontrol positif | 3 | 7,0000 | | |
| dosis 1 | 3 | 10,3333 | 10,3333 | |
| dosis 2 | 3 | | 14,0000 | 14,0000 |
| kontrol negatif | 3 | | | 15,0000 |
| dosis 3 | 3 | | | 17,3333 |
| Sig. | | ,033 | ,022 | ,040 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

folikel_primer

Duncan

| perlakuan | N | Subset for alpha = .01 | | |
|-----------------|---|------------------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| kontrol positif | 3 | 4,0000 | | |
| dosis 1 | 3 | 6,6667 | 6,6667 | |
| dosis 2 | 3 | | 10,0000 | 10,0000 |
| kontrol negatif | 3 | | | 15,0000 |
| dosis 3 | 3 | | | 15,0000 |
| Sig. | | ,136 | ,070 | ,016 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

folikel_sekunder

Duncan

| perlakuan | N | Subset for alpha = .01 | |
|-----------------|---|------------------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| kontrol positif | 3 | 1,0000 | |
| dosis 1 | 3 | 1,8333 | 1,8333 |
| dosis 2 | 3 | 1,8333 | 1,8333 |
| kontrol negatif | 3 | 5,0000 | 5,0000 |
| dosis 3 | 3 | | 5,1667 |
| Sig. | | ,011 | ,026 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

folikel_de_graaf

Duncan

| perlakuan | N | Subset for alpha = .01 |
|-----------------|---|------------------------------|
| | | 1 |
| kontrol positif | 3 | ,8333 |
| dosis 1 | 3 | 1,0000 |
| dosis 2 | 3 | 1,1667 |
| dosis 3 | 3 | 2,0000 |
| kontrol negatif | 3 | 2,6667 |
| Sig. | | ,012 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.