



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELAI TERHADAP
STRUKTUR UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIIEKTOMI**

SKRIPSI

Oleh:

**Nidaul Hikmah
NIM 111810401039**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELA TERHADAP
STRUKTUR UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIIEKTOMI**

SKRIPSI

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

Oleh:

**Nidaul Hikmah
NIM 111810401039**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

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

1. ibunda dan Ayahanda tercinta, terimakasih atas segala limpahan doa, kasih sayang, pengorbanan, dan dukungannya yang tiada henti;
2. keluarga besar tercinta yang telah memberi doa dan banyak motivasi;
3. guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang telah mendidik dan membagikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya Allah sekali-kali tidak akan merubah sesuatu nikmat yang telah dianugerahkan-Nya kepada sesuatu kaum, hingga kaum itu merubah apa yang ada pada diri mereka sendiri”

(QS.An Anfaal 8 : 53)

“Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri”

(QS. Ar- Rad 13:11)

-
- *) Yayasan Penyelenggara Penerjemah/Penafsir Al Quran. 1971. *Al Quran dan Terjemahan*. Saudi Arabia.
- ***) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penerjemah /Penafsiran Al Qur'an. 2009. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bogor: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nidaul Hikmah

NIM : 111810401039

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Efek Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai Terhadap Struktur Uterus Mencit (*Mus musculus*) Strain Swiss Webster Ovariectomi" 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 ijin 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, 12 November 2015

Yang Menyatakan,

Nidaul Hikmah

NIM 111810401039

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG TEMPE KEDELAI TERHADAP
STRUKTUR UTERUS MENCIT (*Mus musculus*) STRAIN
SWISS WEBSTER OVARIEKTOMI**

Oleh

Nidau Himah
NIM 111810401039

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Eva Tyas, M. Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Mahriani, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Efek Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai Terhadap Struktur Uterus Mencit (*Mus musculus*) Strain Swiss Webster Ovariektomi**”,

telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

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

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Anggota I,

Anggota II,

Sri Mumpuni W.W., S.Pd., M.Si
NIP 197105101999032002

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si
NIP 196411051989022001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Efek Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai Terhadap Struktur Uterus Mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi; Nidaul Hikmah, 111810401039;2015: 44halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Uterus menjadi salah satu organ reproduksi yang dipengaruhi oleh kerja hormon estrogen, estrogen bekerja dengan meningkatkan proliferasi sel-sel pada uterus. Penurunan fungsi ovarium menyebabkan kadar estrogen dalam tubuh berkurang sehingga terjadi perubahan fisiologis pada sistem reproduksi seperti dijumpai pada wanita menopause, menopause dapat menyebabkan uterus tidak berkembang dan atrofi pada miometrium.

Gangguan yang diakibatkan oleh sindrom menopause dapat ditanggulangi dengan pemberian fitoestrogen yang merupakan senyawa alami dari tanaman, Fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen yang menghasilkan efek estrogenik yang mirip estrogen endogen. Kedelai merupakan salah satu tanaman yang berfungsi sebagai fitoestrogen, tempe memiliki kandungan isoflavon yang menyerupai struktur estrogen 17β -estradiol pada mamalia. Tempe yang dikenal sebagai produk konsumsi hasil fermentasi dari kedelai dilaporkan mengandung senyawa isoflavon.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh tepung tempe kedelai terhadap Mencit (*Mus musculus*) strain swiss webster yang ovariektomi. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental dengan hewan uji berupa mencit betina strain Swiss Webster ovariektomi sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok Kontrol Negatif (mencit kontrol normal), Kontrol Positif (mencit kontrol ovariektomi), D1 (0,21 g/ml/hari ekstrak tepung tempe kedelai), D2 (0,42 g/ml/hari ekstrak tepung tempe kedelai), D3 (0,63 g tepung tempe). Parameter pengamatan yang dilakukan adalah berat basah uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung tempe kedelai mengakibatkan peningkatan rata-rata pada berat uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium selama perlakuan 10 dan 20 hari. Peningkatan rata-rata tertinggi terdapat pada dosis 0,63 gr/ml dengan berat uterus 0,043 g, tebal endometrium 389,46 μm dan tebal miometrium 71,30 μm .

PRAKATA

Puji Syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Tepung Tempe Kedelai Terhadap Struktur Uterus Mencit (*Mus musculus*) Strain Swiss Webster Ovariektomi”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada 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. Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dra. Mahriani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Sri Mumpuni W.W., S.Pd., 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. Dra. Dwi Setyati, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Efi Fadjriyah E.D selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak membantu demi kelancaran selama penelitian berlangsung;
5. kedua orangtuaku tercinta, adikku, dan keluarga besarku terimakasih atas limpahan kasih sayang, pengorbanan, motivasi dan doanya demi terselesaikannya skripsi ini;
6. teknisi Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Bapak Wasino yang banyak membantu serta membina selama penulis bekerja di laboratorium;

7. rekan kerja selama penelitian Arlina mustika dan Risa Oktaviana, terima kasih atas kerjasamanya dan tidak ada yang tidak bisa kita selesaikan;
8. sahabat-sahabatku Nur putri, Anis Barokah, Dia Qori, Dita Ayu Faradila, Katrin Rawung, dan anak kost bangka 05, terima kasih atas segala bantuan, doa, masukan serta semangat kepada saya;
9. teman-teman tercinta angkatan 2011 Jurusan Biologi Universitas Jember yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.
10. semua pihak yang telah memberikan sumbangan 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, 12 November 2015

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	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Anatomi dan Histologi Uterus	4
2.2 Hormon Estrogen dan Peranannya pada Uterus	7
2.3 Kontrol Hormonal Reproduksi Betina	8
2.4 Kandungan Tempe Kedelai	9
2.5 Hipotesis	11
BAB 3. METODE PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	12

3.2 Alat dan Bahan	12
3.3 Rancangan Penelitian	13
3.4 Prosedur Penelitian	14
3.5 Metode Penelitian	16
3.5.1 Pemeliharaan Hewan Uji	16
3.5.2 Ovariectomi Mencit.....	16
3.5.3 Pembuatan Ekstrak Tepung Tempe Kedelai.....	16
3.5.4 Perlakuan Hewan Uji	16
3.5.5 Pembuatan Preparat Histologi Uterus.....	16
3.6 Parameter yang diamati	19
3.7 Analisis Data	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap Berat Uterus Mencit Swiss Webster Ovariectomi	21
4.2 Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap terhadap Tebal endometrium Mencit Swiss Webster Ovariectomi	24
4.3 Pengaruh Ekstrak Tepung Tempe Kedelai terhadap terhadap Tebal miometrium Mencit Swiss Webster Ovariectomi	26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata berat uterus mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai.....	21
4.2 Rata-rata berat tebal endometrium mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai	24
4.3 Rata-rata berat tebal miometrium mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedela.....	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi uterus mencit strain Swiss webster	4
2.2 Histologi uterus mencit strain Swiss webster	5
2.3 Struktur kimia Estrogen	7
2.4 Struktur kimia isoflavon.....	8
3.1 Alur kegiatan penelitian	15
4.1 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap berat uterus mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai	23
4.2 Perbedaan morfologi uterus akibat ekstrak tepung tempe kedelai.....	24
4.3 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap tebal endometrium mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai	26
4.4 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap tebal endometrium mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai	28
4.5 Grafik pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap tebal miometrium mencit strain Swiss Webster ovariektomi selama 10 sampai 20 hari pasca pemberian ekstrak tepung tempe kedelai	29

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penentuan Dosis	37
B. Hasil Uji statistik Oneway ANOVA pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap berat uterua	38
C. Hasil Uji statistik Oneway ANOVA pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap tebal endometrium -	40
D. Hasil Uji statistik Oneway ANOVA pengaruh ekstrak tepung tempe kedelai terhadap tebal miometrium	42
E. Hasil Analisis Uji T berat uterus hari ke-10 dan hari ke-20 pasca ovariektomi	44
F. Hasil Analisis Uji tebal endometrium hari ke-10 dan hari ke-20 pasca ovariektomi	45
G. Hasil Analisis Uji tebal miometrium hari ke-10 dan hari ke-20 pasca ovariektomi	46
G. Preparat penampang melintang histologi uterus perbesaran 100x	46

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Reproduksi merupakan proses fisiologis yang terjadi pada makhluk hidup untuk mempertahankan keturunannya. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan reproduksi adalah keseimbangan hormon reproduksi (Turner dan Bagnara, 1976). Hormon yang berperan penting pada reproduksi wanita adalah estrogen dan progesteron yang dihasilkan oleh ovarium (Nalbandov, 1990). Secara umum progesteron berperan dalam mengatur siklus menstruasi dan estrogen berperan dalam merangsang perkembangan kelenjar mammae, merangsang siklus estrus dan persiapan uterus untuk implantasi (Hafez *et al.*, 2000).

Uterus menjadi salah satu organ reproduksi yang dipengaruhi oleh kerja hormon estrogen. Estrogen menstimulasi kerja hormon progesteron dalam proliferasi sel-sel pada uterus (Mark *et al.*, 2000). Endometrium menjadi lapisan pada uterus yang paling responsif terhadap adanya perubahan hormon reproduksi dan menyebabkan perubahan lapisan endometrium menjadi bervariasi (Dellman and Brown, 1992). Proses proliferasi kelenjar endometrium diawali dengan terikatnya estrogen dengan reseptor yang terdapat pada sel-sel penyusun endometrium (Burkitt *et al.*, 1999).

Penurunan fungsi ovarium menyebabkan kadar estrogen dalam tubuh berkurang sehingga terjadi perubahan fisiologis pada sistem reproduksi seperti dijumpai pada wanita menopause (Cassidy *et al.*, 2006). Gangguan yang diakibatkan oleh penurunan fungsi ovarium pada wanita menopause, antara lain: uterus tidak berkembang dan terjadi atrofi pada miometrium (Ganong, 2003).

Gangguan akibat menopause dapat ditanggulangi dengan pemberian fitoestrogen yang merupakan senyawa alami dari tanaman (Setchell & Aedin, 1999). Fitoestrogen mampu berikatan dengan reseptor estrogen yang menghasilkan efek estrogenik yang mirip estrogen endogen (Zhang *et al.*, 2009). Salah satu tanaman yang mengandung senyawa isoflavon yang berfungsi sebagai fitoestrogen adalah kedelai (Urasopon *et al.*, 2008). Kedelai memiliki kandungan

isoflavon yang menyerupai struktur estrogen 17β -estradiol pada mamalia (Mense *et al.*, 2008). Astuti (1999) melakukan penelitian mengenai kandungan isoflavon pada kedelai dan didapatkan kandungan 21,34 mg/100g Bk. Tempe yang dikenal sebagai produk konsumsi hasil fermentasi dari kedelai terbukti memiliki kandungan isoflavon yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kedelai tanpa fermentasi serta memiliki kandungan gizi yang berguna bagi kesehatan (Nakajima *et al.*, 2005). Tempe dilaporkan mengandung senyawa isoflavon sebanyak 77,98mg/100g Bk (Astuti, 1999).

Penelitian mengenai penggunaan bahan alami yang mengandung isoflavon untuk meningkatkan kadar estrogen dan fungsi uterus pasca ovariektomi antara lain dilakukan oleh Suhargo (2005), membuktikan terjadinya peningkatan berat uterus seiring dengan pemberian fitoestrogen dari ekstrak daun handeleum dengan dosis 0,1 mg; 0,5 mg; dan 1 mg secara *gavage* selama 8 minggu memberikan peningkatan pada berat uterus jika dibandingkan dengan kontrol tanpa ekstrak daun handeleum. Safrida (2008) juga melakukan penelitian tentang tikus yang diberi tepung kedelai dan tepung tempe dengan dosis 10 gr bk/100 gr bb/hari menunjukkan adanya peningkatan hormon estrogen.

Mengingat bahan tempe merupakan salah satu produk olahan kedelai yang secara ekonomi terjangkau oleh seluruh lapisan masyarakat maka perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian ekstrak tepung tempe kedelai pada Mencit (*Mus musculus*) strain swiss webster yang diovariektomi. Hal tersebut dilakukan untuk melihat adanya efek estrogenik pada ekstrak tepung tempe dengan kandungan isoflavon terhadap struktur uterus.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang, diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dapat meningkatkan berat basah uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi?

2. Berapakah dosis dan lama pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang paling berpengaruh pada berat basah uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengatahui pengaruh dari pemberian ekstrak tepung tempe kedelai terhadap berat basah uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi.
2. Mengetahui dosis dan lama pemberian ekstrak tepung tempe kedelai yang paling berpengaruh pada berat basah uterus, tebal endometrium dan tebal miometrium mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi.

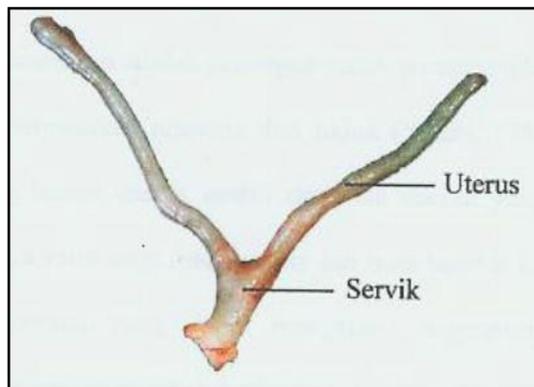
1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak tepung tempe kedelai sebagai salah satu terapi alami hormon estrogen terhadap wanita yang telah menopause khususnya terhadap perubahan struktur uterus seperti atrofi pada endometrium dan miometrium.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi dan Histologi Uterus

Uterus merupakan suatu organ muskular berongga yang memiliki dinding tebal dan terdiri dari otot-otot polos. Uterus terdiri dari fundus uteri, corpus uteri dan serviks uteri. Bagian fundus uteri adalah bagian uterus proksimal, bagian ini tempat kedua tuba falopi masuk dalam uterus, serta serviks yaitu bagian bawah yang berbentuk silindris yang bermuara ke dalam vagina (Prawiroharjo, 2005) Struktur uterus dilihat pada Gambar 2.1. Secara histologi dinding uterus terdiri atas tiga lapisan antara lain lapisan perimetrium, muscular atau miometrium dan lapisan endometrium (Lesson and Paparo, 1996). Struktur uterus dapat dilihat pada Gambar 2.1.

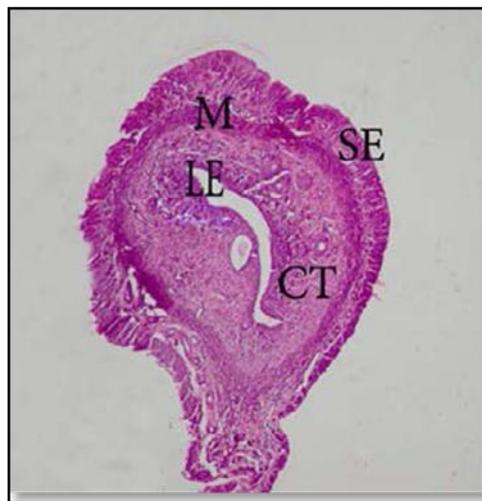


Gambar 2.1 Organ uterus mencit swiss webster (Sumber : Puspitadewi dan sunarno, 2007).

Dinding uterus terdiri atas tiga lapisan antara lain perimetrium, miometrium dan endometrium (Lesson and Paparo, 1998). Perimetrium atau lapisan serosa merupakan lapisan yang terdiri atas selapis sel mesotelial yang ditopang oleh jaringan ikat tipis. Miometrium atau lapisan muscular merupakan lapisan paling tebal dari uterus dengan ketebalan sekitar 12-15cm, lapisan tersebut memiliki serat otot polos yang dipisahkan oleh kolagen dan serat elastik (Cicilia, 2013). Miometrium memiliki berkas otot polos yang membentuk tiga lapisan, pada lapisan otot dalam dibentuk oleh serat-serat yang tersusun memanjang (*stratum*

subvasculer), lapisan otot tengah tersusun melingkar dilengkapi dengan banyak pembuluh darah (*stratus vasculer*) dan lapisan otot luar memanjang yang tipis dibawah peritonium disebut *stratum suprasculer* (Lesson and Paparo, 1996).

Lapisan endometrium terdiri atas epitel dan lamina propia yang mengandung kelenjar tubular simpleks (Cicilia, 2013). Sel epitel pada endometrium terdiri dari epitel selapis silindris bersilia dan memiliki tiga daerah fungsional, yaitu stratum basalis, stratum spongiosum dan stratum kompakum. Stratum spongiosum dan kompakum disebut sebagai stratum fungsional. Stratum fungsional dilapisi oleh epitel berbentuk kubus selapis yang dapat mengalami degenerasi sebagian atau keseluruhan secara periodik selama siklus menstruasi sedangkan stratum basalis relatif tetap dan bertindak sebagai pembentuk stratum fungsional yang mengalami degenerasi (Burkitt *et al.*, 1993). Histologi uterus dapat dilihat dari gambar 2.2.



Gambar 2.2 Sayatan melintang preparat uterus menci perbesaran 100x (LE) Lumen. (CT) Endometrium, (M) miometrium, (SE) Perimetrium (Sumber : Helmy *et al.*, 2014).

Pada endometrium terdapat pembuluh darah dan kelenjar yang tersusun atas epitel kolumnar serta pembuluh darah yang terdiri dari dua bentuk yaitu spiral dan lurus. Peningkatan hormon estrogen menyebabkan pertumbuhan serta percabangan dari kelenjar endometrium (Cooke *et al.*, 1995). Lapisan endometrium mengalami perubahan berkala mulai dari pubertas dan diakhiri pada

saat *menopause* yang dikenal dengan beberapa fase antara lain yang terdiri dari tahap menstruasi, tahap proliferasi (folikular), tahap progestasi (luteal) dan tahap iskemik atau pramenstruasi (Lesson and Paparo, 1996).

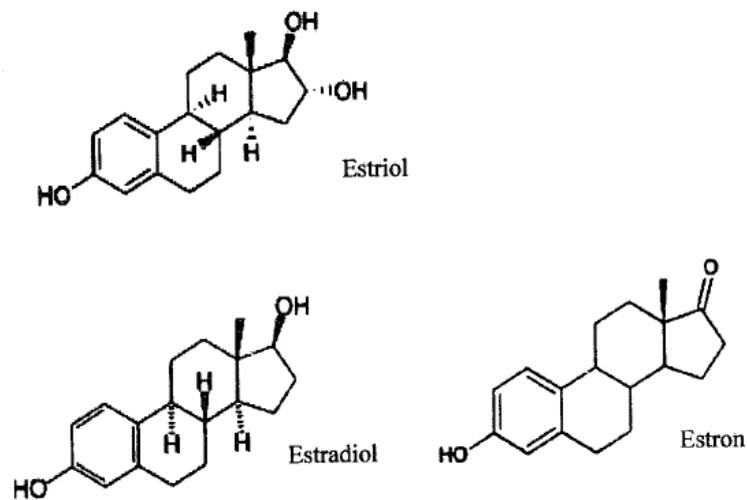
Fase proliferasi (folikuler) dimulai pada akhir menstruasi dan ditandai dengan adanya degenerasi endometrium, mitosis banyak terjadi pada sel kelenjar endometrium dan stroma endometrium, mukosa menebal dari ketebalan 1 mm atau lebih, terjadinya penebalan bersamaan dengan perkembangan folikel ovarium dan sekresi estrogen (Lesson and Paparo, 1996). Estrogen bekerja pada endometrium dengan menginduksi proliferasi sel dan membentuk kembali lapisan fungsional yang hilang selama menstruasi, sel-sel pada ujung basal kelenjar berproliferasi membentuk epitel baru dan menutupi permukaan endometrium yang luruh akibat menstruasi. Pada fase proliferasi endometrium dilapisi epitel selapis silindris dan kelenjar uterus berbentuk tubulus lurus dengan lumen sempit (Mescher, 1979).

Fase progestasi atau sekresi luteal terjadi akibat pembentukan korpus luteum yang mensekresikan progesteron, progesteron merangsang perkembangan sel-sel epitel kelenjar uterus dan sel-sel epitel (Mescher, 1979). Pada fase ini endometrium dapat menebal hingga 5 mm dengan kelenjar yang bergerigi, penebalan disebabkan adanya hipertropi kelenjar, menjelang akhir fase, sel-sel stroma membesar, sitoplasma banyak mengandung ribosom bebas dan jumlah glikogen melimpah (Lesson and Paparo, 1996).

Fase iskemik atau pramenstruasi, fase ini terjadi sekitar 13-14 hari sesudah ovulasi akibat penurunan kadar progesteron dari korpus luteum, fase ini ditandai dengan stroma makin memadat disertai leukosit (Lesson and Paparo, 1996). Fase terakhir adalah menstruasi, menstruasi terjadi akibat tidak adanya pemuahan oosit, corpus luteum akan beregresi dan kadar progesteron dan estrogen darah mulai menurun 8-10 hari setelah ovulasi yang menyebabkan kanmenstruasi, Lapisan fungsional endometrium termasuk epitel permukaan, dan kelenjar keluar sebagai darah menstruasi, pada akhir menstruasi endometrium menjadi lapisan tipis dan akan memulai siklus baru setelah sel-sel mulai membelah untuk memulihkan mukosanya (Mescher, 1979).

2.2 Hormon estrogen dan Peranannya pada Uterus

Estrogen merupakan salah satu hormon reproduksi wanita yang dihasilkan oleh ovarium. Struktur hormon estrogen tersusun atas 18 atom C, gugus OH fenolik pada C-3, sifat aromatik cincin A, serta tidak memiliki gugus metil pada C-10, estrogen dalam tubuh hewan betina berupa estradiol-17 β , estron (E₁) dan estriol (E₃) (Dellman dan Brown, 1992). Bentuk-bentuk estrogen dapat dilihat pada gambar Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur kimia estrogen (Sumber: Guyton, 1995).

Pada siklus menstruasi pertama (*menarche*) sampai menopause, estrogen utama merupakan Estradiol -17 β . Estradiol -17 β menjadi hormon yang paling dominan dalam tubuh karena jumlahnya paling banyak serta aktivitasnya paling tinggi (Cao *et al.*, 2004). Estradiol-17 β , estron dan estriol disintesa dari dalam tubuh dengan bantuan enzim. Estradiol dikonversi dari testosteron didalam sel granulosa dengan enzim aromatase atas stimulasi dari FSH (Johnson & Everitt, 1988). Estron ditemukan lebih banyak dari pada estradiol pada pascamenopause (Cao *et al.*, 2004).

Estrogen dalam tubuh akan berikatan dengan reseptor estrogen yaitu estrogen reseptor α (ER α) dan estrogen reseptor β (ER β) (Faustini *et al.*, 1999). ER α dan ER β akan diekspresikan pada jaringan reproduksi seperti ovarium, endometrium, sel stroma miometrium dan payudara, ER β dominan pada sel granulosa dan ER α dominan pada endometrium (Brown, 2004). ER α merupakan

bentuk yang lebih menentukan fungsi dan perilaku seksual (Grenstein & Wood, 2006).

Hormon estrogen memberikan efek estrogenik yang meliputi pertumbuhan payudara, menjaga kesuburan rahim, menjaga kehalusan kulit, mencegah osteoporosis dan kolesterol dalam tubuh (Cao *et al.*, 2004). Estrogen pada uterus berperan untuk meningkatkan massa endometrium dan miometrium (Turner dan Bagnara 1988).

2.3 Kontrol Hormonal Reproduksi betina

Proses reproduksi betina dimulai saat hewan mencapai usia dewasa. Aktivitas reproduksi pada tikus putih dimulai dengan terjadinya siklus estrus. Mekanisme siklus estrus menyebabkan pergantian fase yang terjadi pada ovarium yaitu pada fase folikular dan luteal (Campbell *et al.*, 2004).

Fungsi ovarium secara langsung diatur oleh hormon dari hipofisis anterior yaitu FSH dan LH yang diatur oleh *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). Ovarium berada pada fase folikular dan fase luteal secara bergantian karena adanya pengaruh dari *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Fase folikular didominasi oleh pematangan folikel dan sekresi dari estrogen dan fase luteal ditandai dengan disekresikannya progesteron oleh korpus luteal yang diaktifkan oleh gonadotropin (Nalbandov, 1990).

Perkembangan folikel diatur oleh hormon FSH, folikel yang berkembang akan memproduksi estrogen (Sherwood, 2001). Peningkatan estrogen dalam darah menyebabkan pituitari mengurangi produksi FSH dan meningkatkan pelepasan LH yang menyebabkan folikel mengalami ovulasi. Ovulasi menyebabkan folikel de Graff menjadi korpus luteum dan disekresikan progesteron atas stimulasi LH (Nalbandov, 1990). Kadar estrogen dan progesteron akan menurun saat korpus luteum terdegradasi dan akan meningkat kembali dan merangsang perkembangan folikel baru saat fase folikular. Fase-fase uterus terjadi bersamaan dengan fase folikular dan fase luteal selama siklus dan mencerminkan pengaruh hormon ovarium terhadap uterus. Estrogen yang disekresikan saat fase folikuler digunakan

untuk proliferasi sel-sel pada uterus yang menyebabkan penebalan endometrium (Sherwood, 2001).

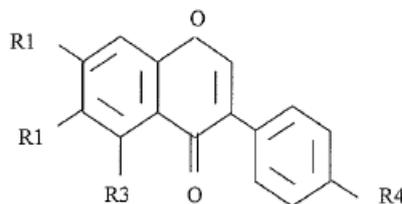
Menopause merupakan kegagalan ovarium akibat hilangnya fungsi folikular dari ovarium yang disertai defisiensi dari estrogen yang menyebabkan terhentinya secara permanen siklus menstruasi dan hilangnya fungsi reproduktif (Torpy *et al.*, 2007). Fase *menopause* dicirikan dengan jumlah folikel yang mengalami atresi makin meningkat sehingga produksi estrogen berkurang dan tidak terjadi haid lagi. Wanita yang tidak mengalami haid selama 12 bulan, dan mempunyai kadar FSH darah >40 ml U/ml dan kadar estradiol < 30 pg/ml diartikan bahwa wanita tersebut telah mengalami *menopause* (Ismail, 2008).

Kadar estradiol pada wanita menopause antara 20-30 pg/ml, dan kadar hormon gonadotropin meningkat karena terhentinya produksi inhibin akibat tidak tersedianya folikel dalam jumlah yang cukup (Ismail, 2008). Rendahnya kadar estrogen pada wanita menopause dapat menyebabkan uterus tidak berkembang, miometrium atrofi (Ganong, 2003).

2.4 Kandungan Tempe Kedelai

Kedelai merupakan salah satu tanaman polong-polongan yang menjadi bahan dasar makanan seperti kecap, tahu dan tempe. Kedelai mengandung protein yang berkisar 35% , karbohidrat 35% , dan lemak 18-20 % dan mengandung vitamin A, vitamin B6, vitamin B12, vitamin C, vitamin K, kalsium, zat besi, magnesium, fosfor, kalium, natrium dan seng (Koswara, 1992). Selain kandungan gizi yang tinggi kedelai juga merupakan sumber isoflavon yang berfungsi sebagai zat estrogenik (Astuti, 1999).

Isoflavon merupakan senyawa yang termasuk golongan terbesar dalam flavonoid yang umumnya terdapat dalam tanaman *leguminosae* atau kacang-kacangan (Urasopon *et al.*, 2008). Isoflavon tidak terdapat pada mikroorganisme seperti bakteri, alga, jamur dan lumut tetapi beberapa mikroba diidentifikasi dapat membantu biotransformasi isoflavon. Struktur dasar dari senyawa isoflavon terdiri atas 2 cincin benzen yang berikatan melalui cincin karbon heterosiklik (Harborne, 1992). Struktur isoflavon dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur kimia isoflavon (Sumber : Naim *et al.*, 1974)

Tempe menjadi makanan tradisional Indonesia berasal dari kedelai yang terfermentasi. Fermentasi tempe terjadi akibat adanya aktifitas kapang *Rhizopus sp.* pada kedelai (Naim *et al.*, 1974). Enzim protease yang terdapat pada kapang menyebabkan protein terurai menjadi asam amino bebas yang akan lebih mudah dimanfaatkan oleh tubuh (Murata *et al.*, 1967). Kandungan zat gizi tempe dalam 100 gam terdiri dari 18.3% protein, 4% lemak, 12.7% karbohidrat, 0.129% kalsium, 0.154% fosfor dan 0.01% zat besi (Santoso, 2005).

Fermentasi pada tempe menyebabkan terbentuknya senyawa isoflavon dalam bentuk bebas (aglikon) serta terbentuknya senyawa faktor II (6,7,4'-trihidroksiisoflavon), Senyawa faktor II berpotensi sebagai antioksidan (Wang & Murphy, 1994). Faktor II dapat berperan sebagai antikontriksi pada pembuluh darah dan dapat mengurangi terbentuknya kerak lemak pada dinding pembuluh darah (*atherosclerosis*) (Jha *et al.*, 1997). Struktur Isoflavon dalam tempe terdapat dalam empat bentuk, yaitu bentuk Aglikon: daidzein, genistein dan glisitein ; Glikosida: daidzin, genistin dan glisitin; Asetilglikosida : 6-0-asetildaiszin, 6-0-asetilgenestin dan 6-0-asetilglisin; dan Isoflavon malonilglikosida: 6-0-malonildaidzin, 6,0-malonilgenestein dan 6-0 malonilglisitin (Wang dan Murphy, 1994).

Senyawa isoflavon memiliki struktur kimia menyerupai estrogen serta dapat berikatan dengan reseptor estrogen, Oleh sebab itu isoflavon sering disebut fitoestrogen atau estrogen nabati (Delmonte & Rader, 2006). Senyawa isoflavon dapat berfungsi dalam mengatasi masalah menopause serta memiliki aktivitas fitoestrogen atau estrogen nabati (Delmonte & Rader, 2006). Senyawa isoflavon dapat berfungsi dalam mengatasi masalah menopause serta memiliki aktivitas

dalam meningkatkan massa uterus (Setchell & Aedin, 1999; Ford *et al.*, 2006). Astuti (1999) menyatakan bahwa genistein dan daidzin menjadi isoflavon utama yang ditemukan pada senyawa fitoestrogen dalam tempe.

2.5 Hipotesis

Pemberian ekstrak tepung tempe kedelai dapat meningkatkan berat uterus, tebal endometrium dan miometrium pada Mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi.

BAB 3. METODOLOGI 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, serta Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Unit 4 (LPPT 4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Juni 2015.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri dari alat persiapan penelitian, alat ekstraksi tepung tempe, alat ovariektomi dan alat pembuatan preparat histologi. Alat persiapan penelitian meliputi 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 (*Ohaus*), jarum sonde lambung ujung tumpul 20 gauge 5cm, botol minum mencit.

Alat Ovariektomi terdiri dari papan bedah, *sprit injection (Terumo Syringe)* 0,45 x 13 mm, *sprit injection (Terumo Syringe)* 0,65 x 32 mm, Silet (*Gold*), Pinset (*Yamako*), Ekskavator (*SMIC*), *paratus case*, lampu operasi, jarum sutura nomor 2 (*One Med*), klem arteri (*One Med*), klem *kocher (One Med)*, *Needle holder (One Med)*, pinset anatomi (*One Med*), pinset sirugis (*One Med*), gunting *metzenbaum (One Med)*, gunting balutan (*One Med*), gunting runcing (*One Med*), klem *mosquito (One Med)*.

Alat ekstraksi tepung tempe terdiri dari *beaker glass 1000ml (Iwaki pyrex)*, *beaker glass 600ml (Iwaki pyrex)*, *beaker glass 200ml (Iwaki pyrex)*, gelas ukur 100ml, botol *scott 100ml (Duran)*, botol *scott 500ml (Duran)*, corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen 75cc, grinder, saringan tepung 70mesh '*Retsch*', *Lab Stirrer electricity*, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki *stainless steel*, baki plastik, pisau, talenan, sendok plastik, spatula, cup kecil.

Alat Pembuatan preparat terdiri dari gelas objek, gelas penutup, *rotary microtome*, oven, botol reagen, mikroskop optik lab ‘*Olympus*’, *staining jar*, flakon, Oven (*Incucell*), *holder*, skalpel, *hot plate*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari bahan persiapan, bahan ekstraksi tepung tempe, bahan ovariektomi dan bahan pembuatan preparat histologi. Bahan persiapan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain Swiss Webster ovariektomi umur 90 hari dengan berat 35 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM) Yogyakarta, pakan pellet (*CP511*), aquades steril.

Bahan Ovariektomi terdiri dari ketamil 10%, *xyla*, benang silk nomor 3 (*One med*), benang *catgut* nomor 3 (*One med*), sekam padi steril, serbuk gergaji kayu steril, *betadine (Povidone Iodine)* 10%, Alkohol 70% (*Mediss*), antibiotik (*Levofloxacin*), cairan infus 0,9% ‘*Sodium Chloride*’ (*Cotsu-NS*), kasa steril (*One Med*), *tissue. gloves*, masker.

Bahan ekstraksi tepung tempe terdiri dari tempe kedelai, Alkohol 70 %, kertas saring, *tissue*, Kain saring serta bahan pembuatan preparat histologi yaitu *chloroform*, larutan fiksatif BPS formalin, NaCl 0,9 %, parafin, gliserin dan albumin, alkohol bertingkat, alkohol absolut, pewarna Hematoxylin dan Eosin (HE), xylol, entelan.

3.3 Rancangan Penelitian

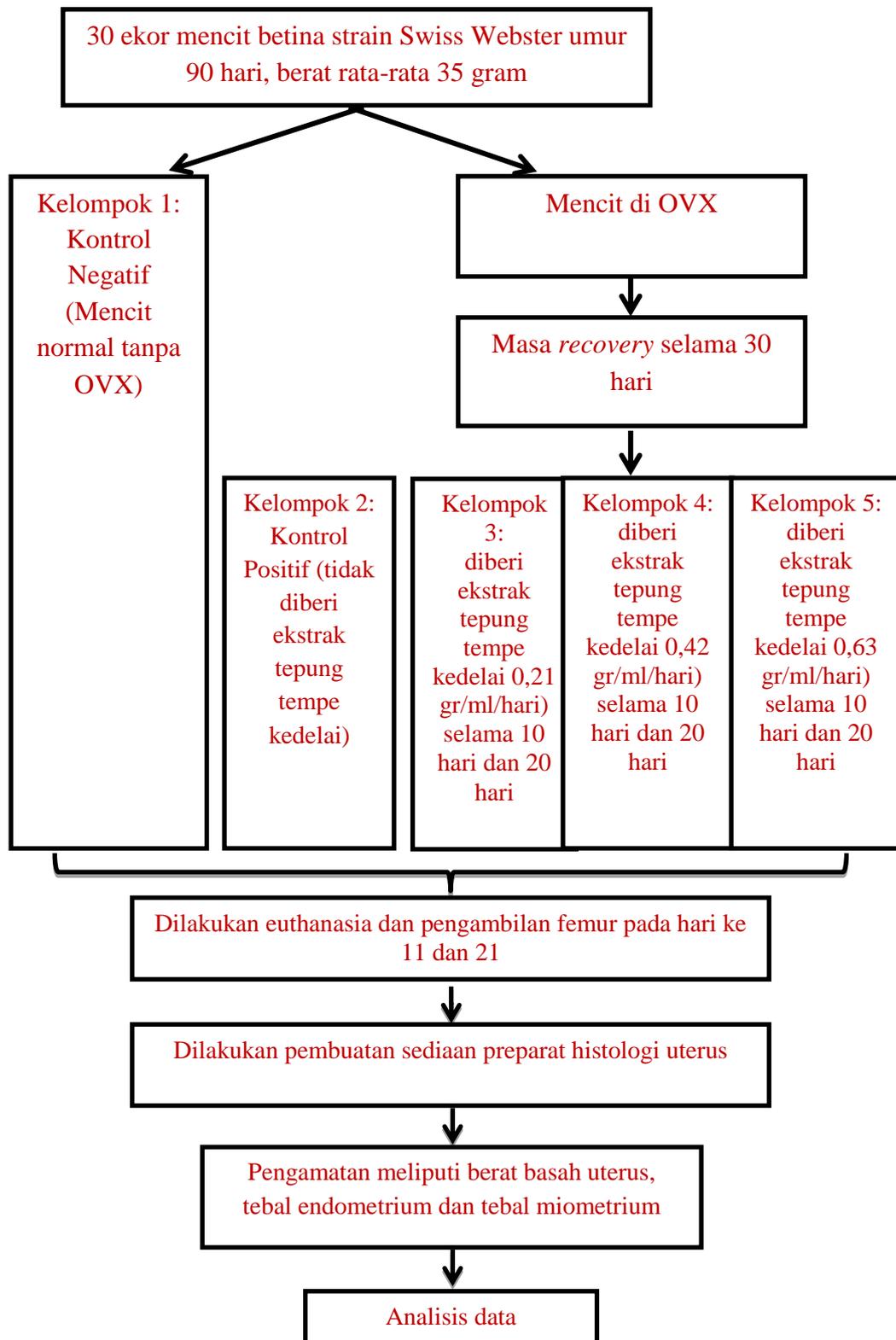
Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang bertujuan untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok uji yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Variabel bebas pada perlakuan ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung tempe kedelai. Variabel terikatnya adalah struktur uterus mencit pasca ovariektomi.

Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit (*Mus musculus*) strain Swiss Webster ovariektomi umur 90 hari dengan berat 35 gram. Mencit tersebut dibagi menjadi empat kelompok dengan tiga pengulangan dengan prosedur :

- Kelompok 1 : Kelompok kontrol mencit tanpa ovariektomi (OVX) dengan pellet atau pakan standar setiap hari.
- Kelompok 2 : Kelompok kontrol mencit ovariektomi (OVX) dengan pellet atau pakan standar setiap hari.
- Kelompok 3 : Kelompok perlakuan berupa mencit ovariektomi (OVX) yang diberi ekstrak tepung tempe kedelai dengan dosis 0,21 gram setiap hari selama 10 dan 20 hari.
- Kelompok 4 : Kelompok perlakuan berupa mencit ovariektomi (OVX) yang diberi ekstrak tepung tempe kedelai dengan dosis 0,42 gram setiap hari selama 10 dan 20 hari.
- Kelompok 5 : Kelompok perlakuan berupa mencit ovariektomi (OVX) yang diberi ekstrak tepung tempe kedelai dengan dosis 0,63 gram setiap hari selama 10 dan 20 hari.

3.4 Prosedur penelitian

Secara keseluruhan rangkaian kegiatan penelitian digambarkan sebagaimana alur penelitian pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Alur kegiatan penelitian

3.5 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu : persiapan hewan uji, pembuatan ekstrak tepung tempe kedelai, pembuatan hewan uji ovariektomi, tahap pengambilan sampel preparat histologi uterus, 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 diovariektomi dan diadaptasikan dalam kandang selama 30 hari masa *recovery* . 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 standart berupa pellet (*CP511*) 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 berusia 90 hari yang dibius dengan ketamil 10% dan Xyla dengan perbandingan 1:1 dengan dosis 0,05 ml secara intramuskular. Mencit dibaringkan secara terlentang pada papan operasi dan diolesi dengan air sabun antibakteri serta *betadine* pada bagian medial perut, dilakukan pencukuran rambut pada bagian medial perut dengan menggunakan silet. Langkah 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 1cm. Selanjutnya dikeluarkan semua bagian organ reproduksinya untuk mencari ovarium kanan dan kiri kemudian dijepit dengan klem arteri dan diikat bagian ujung oviduct dengan silk, ovarium dipotong secara perlahan dengan gunting *matzenbaum* dan arteri klem arteri dilepas. Organ dalam yang telah dikeluarkan direposisi kembali dalam abdomen dan diberi 0,5 ml larutan *Sodium Chloride* 0,9 % .

Setelah ovarium yang berhasil diangkat, segera dilakukan penutupan pada bagian *muskulus oblikus abdominis internus* dengan cara dijahit dengan menggunakan *cut gut chromic* ukuran 3.0. Digunakan benang silk ukuran 3.0 dan jarum sutura untuk menjahit *muskulus oblikus abdominis eksternus*. Luka akibat pembedahan dapat 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 Tempe Kedelai

Tempe kedelai murni dengan fermentasi 2 x 24 jam dipotong kecil kemudian ditimbang berat basah dan dioven pada suhu 44 – 46°C selama dua hari dan digiling dengan menggunakan grinder hingga menjadi tepung, dilakukan pengayakan 70 mesh agar mendapatkan tekstur yang halus, selanjutnya tepung tempe yang diperoleh dari pengayakan dibuat ekstrak dengan diberi pelarut alkohol 70% dengan perbandingan 1:4. Larutan dihomogenkan menggunakan *stirrer elektrik* dengan kecepatan 500rpm dan dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat murni tanpa alkohol, kemudian filtrat di *waterbath* selama ± 8jam untuk mendapatkan filtrat murni dalam bentuk pasta.

3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Pada penelitian digunakan 35 ekor mencit betina galur Swiss Webster yang telah diovariectomi dan dipelihara selama 35 hari untuk masa *recovery*. Mencit kemudian dibagi menjadi dua perlakuan yaitu kontrol pada mencit ovariektomi yang diberi pakan pellet standart dan ovariektomi yang diberi perlakuan dengan ekstrak tepung tempe secara oral (*gavage*) dengan dosis 0,21 gram; 0,42 gram; 0,63 gram diberikan setiap hari selama 10 hari dan 20 hari.

3.5.5 Pembuatan preparat histologi uterus

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

3.5.5.1 Fiksasi dan Dehidrasi dan *Clearing*

Organ uterus 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 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 uterus di jernihkan dengan xilol selama 4-6 jam.

3.5.5.2 Infiltrasi dan *Embedding* (penanaman)

Infiltrasi parafin dilakukan pada suhu 50-56°C , menggunakan parafin I,II,III selama 1 jam. Organ ditanam dalam blok parafin yang telah dicairkan. *Embedding* dilakukan secara bertingkat menggunakan xylol : parafin selama 30 menit

3.5.5.3 Penyayatan (*Sectioning*) dan perekatan (*Affixing*)

Organ yang akan disayat direkatkan pada holder dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Organ uterus 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, sediaan diwarnai dengan *Hematoxylin* dan *Eosin*.

3.5.5.4 Pewarnaan (*Staining*)

Preparat uterus 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 Xilol I dan II selama 2 menit.

3.5.5.5 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 (Humason,1967).

3.5.6 Parameter yang diamati

3.5.6.1 Berat basah uterus

Organ uterus yang diperoleh setelah pembedahan kemudian dibersihkan dari lemak. Selanjutnya ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk mendapatkan data berat basah yang dinyatakan dalam gram.

3.5.6.2 Ketebalan Endometrium

Pengukuran ketebalan endometrium uterus dilakukan dengan mengukur jumlah diameter endometrium dikurangi diameter lumen pada tiap sampel pada masing-masing dosis dan lama pemberian. Penentuan ketebalan diameter endometrium dilakukan dengan tiga kali pengulangan dengan menggunakan optilab.

3.5.6.3 Ketebalan Miometrium

Pengukuran ketebalan endometrium uterus dilakukan dengan mengukur pada tiap sampel pada masing-masing dosis dan lama pemberian. Penentuan

ketebalan miometrium dilakukan dengan tiga kali pengulangan dengan menggunakan optilab.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *one way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$ dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan dosis, serta menggunakan uji T dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha = 0,05$, untuk mengetahui korelasi antar perlakuan lama hari dengan perlakuan dosis (Steel and Torrie, 1993).