



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja*) TERHADAP PERKEMBANGAN FOLIKEL  
OVARIUM DAN SIKLUS ESTRUS MENCIT (*Mus musculus*)  
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

**SKRIPSI**

Oleh

**Iis Maghfiroh  
NIM 141810401010**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja*) TERHADAP PERKEMBANGAN FOLIKEL  
OVARIUM DAN SIKLUS ESTRUS MENCIT (*Mus musculus*)  
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**Iis Maghfiroh  
141810401010**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang serta sholawat dan salam yang selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Siti Mahsunah dan Ayahanda Bahrudin tercinta, terima kasih atas segala limpahan do'a, kasih sayang, kesabaran dalam mendidik, pengorbanan dan dukungan tanpa henti;
2. keluarga besar tercinta yang telah memberi do'a, motivasi, dan dukungan;
3. guru-guruku sejak TK Bustanul Athfal Aisyiyah, MI Muhammadiyah Salamrejo, MTsN Model Trenggalek, dan SMAN 1 Trenggalek yang telah mendidik dan membagikan ilmunya;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

“... Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberikan ilmu pengetahuan beberapa derajat...”

(QS.Al-Mujadalah 58: 11)

“Jika kalian berbuat baik, sesungguhnya kalian berbuat baik bagi diri kalian sendiri...”

(QS. Al-Isra’ 17: 7).

---

\*) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penterjemah/Pentafsir Al Qur’an. 1971. *Mushaf Al-Qur’an dan Terjemahannya*. Jakarta: Nur Publishing.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Iis Maghfiroh

NIM : 141810401010

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium dan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*) Ovariectomi Unilateral” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dra. Mahriani, M.Si dan dengan sumber dana mandiri 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, 27 Juli 2018

Yang menyatakan,

Iis Maghfiroh  
NIM 141810401010

**SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEPUNG KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja*) TERHADAP PERKEMBANGAN FOLIKEL  
OVARIUM DAN SIKLUS ESTRUS MENCIT (*Mus musculus*)  
OVARIEKTOMI UNILATERAL**

Oleh

Iis Maghfiroh  
NIM 141810401010

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium dan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*) Ovariectomi Unilateral”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 27 Juli 2018

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Dra. Mahriani, M.Si  
NIP 195703151987022001

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd  
NIP 195805281988021002

Anggota II,

Anggota III,

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

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si  
NIP 196310261990022001

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP 196102041987111001

## RINGKASAN

**Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium dan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*) Ovariectomi Unilateral;** Iis Maghfiroh, 141810401010; 2018: 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Siklus estrus adalah suatu periode perubahan fisiologis pada organ reproduksi maupun tingkah laku hewan betina dari periode estrus sebelumnya ke periode estrus berikutnya setelah mencapai pubertas dan menerima jantan untuk kopulasi. Siklus estrus dipengaruhi oleh hormon reproduksi antara lain hormon estrogen. Hormon estrogen dapat memicu proliferasi kelenjar endometrium, meningkatkan proliferasi sel epitel mukosa vagina, dan memberikan umpan balik positif kepada hipofisis untuk mensekresikan *Luteinizing Hormone* (LH) sehingga folikel yang matang akan mengalami ovulasi. Hormon estrogen dapat mengalami defisiensi pasca dilakukan ovariectomi. Defisiensi hormon estrogen dapat menyebabkan folikel ovarium menurun dan siklus estrus memendek. Kondisi defisiensi hormon estrogen dapat diatasi dengan pemanfaatan senyawa fitoestrogen yang berasal dari tanaman kedelai hitam. Kedelai hitam merupakan tanaman dari famili *Leguminosae* yang mengandung senyawa isoflavon berupa genistein, daidzein, dan glycitine. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap perkembangan folikel ovarium dan siklus estrus mencit (*Mus musculus*) ovariectomi unilateral.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Zoologi dan Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Pada penelitian ini digunakan mencit (*Mus musculus*) strain Balb/C yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan dosis 0,42 g/ml/hari, dan kelompok perlakuan dosis 0,63 g/ml/hari. Ekstrak tepung kedelai hitam diberikan secara *gavage*. Perlakuan diberikan sebanyak 1 ml selama 30 hari dilanjutkan dengan pengamatan siklus estrus pada hari ke-20 dan pengambilan ovarium pada hari ke-31. Pembuatan preparat dengan metode parafin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Pengamatan

dilakukan menggunakan mikroskop yang meliputi jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff, korpus luteum, dan hasil sitologi untuk menentukan fase pada siklus estrus. Data penelitian dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* dan uji *Wilcoxon*. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu persiapan hewan uji, pembuatan ekstrak tepung kedelai hitam, preparasi hewan uji ovariektomi unilateral, perlakuan hewan uji, pengamatan siklus estrus, pembuatan prepat histologi ovarium, dan pengamatan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dosis 0,42 g/ml/hari dan dosis 0,63 g/ml/hari pada mencit ovariektomi unilateral dapat meningkatkan jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff, korpus luteum dan periode siklus estrus menjadi lebih panjang sehingga mengembalikan periode siklus estrus mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C ovariektomi unilateral pada kondisi normal.

## PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium dan Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*) Ovariektomi Unilateral”. 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 menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dra. Mahriani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si., selaku Dosen Penguji II, yang telah membantu memberikan saran serta kritik dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. Retno Wimbaningrum, M. Si, dan Fuad Bahrul Ulum, S. Si., M. Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing serta memberikan masukan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ir. Efi Fadjriyah E.D, M.ST., selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu penulis melakukan penelitian;
5. Bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember atas segala bimbingan dan keikhlasan dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
6. kedua kakakku yaitu Ibnu Riza Fachrudin dan Taufik Ridho, adikku Oktavia Nuraini, dan keluarga besarku terimakasih atas limpahan do’a, motivasi, pengorbanan, dan semangat yang tak henti demi terselesaikannya skripsi ini;

7. rekan-rekan kerja selama penelitian (tim OVX 2014), yaitu: Nur Farkah, Masrurotul Hasanah, Siti Nur Aisyah, Nur Aisyah Septiana, dan Dwi Ayu Nur Isadatul Ilmiah; terima kasih atas kerjasama dan dukungannya, kalian rekan kerja yang luar biasa;
8. kakak-kakak yaitu Yenny Febriana Ramadhan Abdi, Lidia Maziyyatun dan Maulfi Dwi Lestari terima kasih atas kerjasamanya, terima kasih atas arahan, bimbingan, dan dukungannya selama penelitian;
9. sahabat-sahabatku Fianda Deviyastuti, Lailly Nur Uswatun Hasanah, Nur Fadilah Anggraeni, Neneng Dwi Saputri, Lisfa Dayani, Nadia Rosada, Eka Imbia Agus Diartika, Rizqi Putri R. L., dan Fifin Maghfiroh, terima kasih atas segala bantuan, do'a, motivasi, masukan, dan semangat yang kalian berikan;
10. teman-teman tercinta angkatan 2014 (MAK-MAK BIVALVIA) Jurusan Biologi Universitas Jember; teman-teman KKN PPM dan KKN Rumah Khodijah, terima kasih atas segala do'a dan dukungannya;
11. 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, 27 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Batasan Masalah</b> .....	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Siklus Estrus dan Perkembangan Folikel</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Siklus Estrus.....	4
2.1.2 Perkembangan Folikel Ovarium .....	5
<b>2.2 Peran Hormon Estrogen terhadap Perkembangan Folikel dan Siklus Estrus</b> .....	<b>8</b>
<b>2.3 Kandungan Isoflavon Kedelai Hitam</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4 Hipotesis</b> .....	<b>11</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>12</b>

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	12
3.2 Alat dan Bahan .....	12
3.3 Rancangan Penelitian .....	13
3.4 Alur Penelitian.....	14
3.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian .....	15
3.6 Parameter Pengamatan pada Penelitian.....	18
3.7 Analisis Data .....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>20</b>
4.1 Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Jumlah Folikel Primer, Folikel Sekunder, Folikel de Graff, dan Korpus Luteum Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) Ovariektomi Unilateral .....	20
4.2 Pengaruh Ekstrak Tepung Kedelai Hitam terhadap Periode Siklus Estrus Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) Strain Balb/C Ovariektomi Unilateral.....	26
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>30</b>
5.1 Kesimpulan .....	30
5.2 Saran.....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>37</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1 Perbandingan jenis sel pada preparat apusan vagina .....	17
4.1 Perhitungan rata-rata jumlah folikel dan korpus luteum mencit betina ovariektomi unilateral .....	20
4.2 Rangkaian folikel dan korpus luteum mencit betina ovariektomi unilateral yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam .....	21
4.3 Perhitungan rata-rata periode siklus estrus pertama dan kedua mencit strain Balb/C ovariektomi yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam (jam).....	26
4.4 Rangkaian periode siklus estrus pertama dan kedua mencit strain Balb/C ovariektomi yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam.....	26

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Perkembangan Folikel Ovarium .....	7
2.2 Kinerja Hormon Selama Perkembangan Folikel Ovarium .....	8
2.3 Struktur Kimia Daidzein, Genistein, dan Glycitein .....	10
3.1 Alur Kegiatan Penelitian .....	14
4.1 Struktur Histologi Folikel Primer, Folikel Sekunder, Folikel De Graff, Korpus Luteum Ovarium setelah Pemberian Ekstrak Kedelai Hitam. ....	24
4.2 Struktur Histologi Ovarium antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Pemberian Ekstrak Tepung Kedelai Hitam.....	25
4.3 Mekanisme Kinerja Estrogen Berikatan dengan Reseptor.....	28

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Penentuan Dosis Ekstrak Tepung Kedelai Hitam .....	37
B. Hasil Analisis <i>Kruskal Wallis-Wilcoxon</i> Menunjukkan Rata-Rata dan Rangking Folikel Primer, Folikel Sekunder, Folikel de Graff, dan Korpus Luteum.....	38
C. Hasil Analisis <i>Kruskal Wallis-Wilcoxon</i> Menunjukkan Rata-Rata dan Rangking terhadap Periode Siklus Estrus Mencit (Mus mucus) Strain Balb/C Ovariectomi Unilateral.....	42

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Siklus estrus adalah suatu periode perubahan fisiologis pada organ reproduksi maupun tingkah laku hewan betina dari periode estrus sebelumnya ke periode estrus berikutnya setelah mencapai pubertas dan menerima jantan untuk kopulasi (Akbar, 2010). Berdasarkan perkembangan folikel ovarium dan pengaruh hormon, siklus estrus dibagi menjadi dua fase yaitu fase folikular dan fase luteal. Fase folikular terdiri atas proestrus dan estrus sedangkan fase luteal terdiri atas metestrus dan diestrus (Toelihere, 1981). Pada fase folikuler, folikel mulai berkembang sampai mencapai tahap kematangan dan mengalami ovulasi sedangkan pada fase luteal terbentuk korpus luteum yang menghasilkan progesteron (Ismudiono, 1996).

Siklus estrus dipengaruhi oleh hormon reproduksi antara lain hormon estrogen. Hormon estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh folikel ovarium yang berkembang (Sherwood, 2010). Pada fase folikular hormon estrogen akan meningkat sehingga memicu proliferasi kelenjar endometrium dan meningkatkan proliferasi sel epitel mukosa vagina (Cooke *et al.*, 1998; Safrida, 2008). Hormon estrogen yang meningkat juga akan memberikan umpan balik positif kepada hipofisis untuk menyekresikan *Luteinizing Hormone* (LH) sehingga folikel yang matang akan mengalami ovulasi (Sherwood, 2010). Pada fase luteal hormon estrogen mengalami penurunan dan korpus luteum yang terbentuk akan menghasilkan hormon progesteron.

Penurunan hormon estrogen atau defisiensi hormon estrogen dapat terjadi pasca dilakukan ovariectomi. Ovariectomi merupakan tindakan pengambilan ovarium pada sistem reproduksi betina (Alagwu dan Nneli, 2005; Suhargo, 2005). Defisiensi hormon estrogen dapat menyebabkan folikel ovarium menurun dan siklus estrus memendek (Morán *et al.*, 2000; Safrida, 2008). Kondisi tersebut mengakibatkan gangguan proliferasi sel-sel uterus sehingga lapisan miometrium mengalami atrofi (Ganong, 2005). Selain itu juga mengakibatkan vaskularisasi

mukosa vagina terganggu sehingga proliferasi dan kornifikasi pada sel-sel epitel vagina menurun (Safrida, 2008).

Kondisi defisiensi hormon estrogen dapat diatasi dengan pemanfaatan senyawa fitoestrogen yang berasal dari tanaman kedelai hitam. Kedelai hitam merupakan tanaman dari famili *Leguminosae* yang mengandung senyawa isoflavon berupa daidzein, genistein, dan glycitine (Nakamura *et al.*, 2001). Daidzein dan genistein merupakan senyawa yang mempunyai sifat estrogenik sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen dan dapat menggantikan peran hormon estrogen endogen (Muhamud, 2013).

Menurut Suprihatin (2008), 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 organ ovarium sehingga sel-sel folikel lebih cepat mengalami pematangan dan mencegah terjadinya atresi. Safrida (2008) menyatakan bahwa pemberian tepung kedelai dan tepung tempe dengan dosis 10 g/100g bb/hari selama 28 hari pada tikus ovariektomi dapat meningkatkan hormon estrogen sehingga fase proestrus dan estrus menjadi lebih panjang. Ulfa (2017), menyatakan bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari dapat meningkatkan proliferasi sel endometrium sehingga dapat meningkatkan jumlah kelenjar endometrium, tebal endometrium, dan tebal miometrium pada uterus mencit ovariektomi unilateral.

Berdasarkan manfaat kedelai hitam sebagai sumber fitoestrogen maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tepung kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap perkembangan folikel ovarium dan periode siklus estrus pada mencit (*Mus musculus*) ovariektomi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah efek pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium dan periode siklus estrus mencit (*Mus musculus*) ovariektomi unilateral?

### 1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak tepung kedelai hitam terhadap peningkatan jumlah folikel ovarium dan periode siklus estrus mencit (*Mus musculus*) pasca ovariektomi unilateral.

### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah mencit betina (*Mus musculus*) Strain Balb/C yang diovariektomi secara unilateral dengan masa *recovery* 90 hari.

### 1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat bahwa kedelai hitam dapat dijadikan alternatif untuk menanggulangi kondisi defisiensi hormon estrogen.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Siklus Estrus dan Perkembangan Folikel

#### 2.1.1 Siklus Estrus

Siklus estrus adalah suatu periode perubahan fisiologis pada organ reproduksi maupun tingkah laku hewan betina dari periode estrus sebelumnya ke periode estrus berikutnya setelah mencapai pubertas dan menerima jantan untuk kopulasi (Akbar, 2010). Siklus estrus dibagi menjadi dua fase yaitu fase folikular dan fase luteal. Fase folikular merupakan fase perkembangan folikel sampai mencapai kematangan dan mengalami ovulasi sedangkan fase luteal merupakan fase terbentuknya korpus luteum (Hunter, 1995). Fase folikuler terdiri dari proestrus dan estrus sedangkan fase luteal terdiri dari metestrus dan diestrus (Toelihere, 1981).

Fase proestrus adalah fase perkembangan folikel yang dipengaruhi oleh *follicle stimulating hormone* (FSH) (Binkley, 1995). Pada fase ini, kadar hormon FSH dan estrogen meningkat sehingga folikel mengalami pertumbuhan dan saluran mukosa vagina mulai dialiri darah secara intensif yang menyebabkan sel-sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi (Toelihere, 1981). Selain itu, hormon estrogen yang meningkat juga dapat meningkatkan aktivitas proliferasi sel kelenjar endometrium yang menyebabkan penebalan pada dinding endometrium uterus (Cooke *et al.*, 1998). Fase proestrus dapat diketahui dengan adanya sel-sel epitel berinti jika dilihat dengan metode apusan vagina.

Fase estrus merupakan fase terjadinya pematangan folikel sampai tahap ovulasi yang ditandai dengan keinginan betina untuk menerima jantan melakukan kopulasi. Pada fase ini, kadar estrogen sangat tinggi sehingga merangsang hipofisis untuk mensekresikan LH untuk terjadi ovulasi (Hafez, 2000). Selain itu, hormon estrogen yang semakin meningkat menyebabkan uterus menegang, mukosa vagina mengalami kornifikasi dengan cepat disertai sekresi lendir, dan terdapat sel-sel yang menanduk (Toelihere, 1981).

Fase metestrus ditandai dengan terbentuknya korpus luteum. Pada fase ini, kadar estrogen menurun dan vaskularisasi berkurang sehingga terjadi

pelepasan sel-sel epitel vagina dan banyak terdapat leukosit pada dinding uterus (Baker *et al.*, 1980). Fase selanjutnya yaitu fase diestrus. Fase ini merupakan fase akhir siklus estrus yang ditandai dengan berkembangnya korpus luteum dan dihasilkannya hormon progesteron. Hormon progesteron berfungsi untuk menjaga uterus tetap berkembang sehingga bisa menjadi tempat embrio. Apabila oosit tidak dibuahi, korpus luteum akan berdegenerasi dan dimulainya siklus estrus kembali untuk berkembangnya folikel. Pada fase ini kadar hormon estrogen rendah, mukosa vagina menipis dan leukosit jumlahnya bertambah (Turner dan Bagnar, 1987).

### 2.1.2 Perkembangan Folikel Ovarium

Proses perkembangan folikel diawali dengan terekrutnya folikel primordial. Secara histologis, folikel primordial terdiri atas satu oosit primer yang dilingkupi oleh satu lapis sel folikel berbentuk gepeng atau skuamous dan lamina basal (Tortora dan Derrickson, 2014). Lamina basal berfungsi untuk mendukung pertumbuhan sel granulosa dan oosit serta menjaga folikel agar tidak terjadi kontak langsung dengan sel-sel lain. Pertumbuhan folikel primordial juga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan lokal yang berfungsi mengatur proliferasi dan diferensiasi sel-sel granulosa. Selama masa perkembangannya, jumlah folikel primordial mengalami penurunan secara progresif atau atresi. Selain itu, folikel juga mengalami perubahan bentuk dari skuamous menjadi kuboid dan masuk ke tahap folikel primer (Anwar, 2005).

Tahapan perkembangan folikel primer dimulai saat hipotalamus mensekresikan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). GnRH akan menstimulus hipofisis anterior untuk mensekresikan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). FSH akan merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel primer. Folikel primer terdiri atas sebuah oosit primer yang dilapisi oleh beberapa lapis sel granulosa berbentuk kuboid. Pada saat folikel primer berkembang, terbentuk lapisan glikoprotein disebut zona pelusida diantara oosit primer dan sel granulosa (Tortora dan Derrickson, 2014). Pada perkembangannya, sel granulosa akan mengekspresikan reseptor FSH sehingga

merangsang peningkatan sekresi FSH yang dapat meningkatkan perkembangan folikel primer. Perkembangan folikel primer juga diiringi dengan perkembangan oosit dan sel granulosa yang berproliferasi. Jaringan ikat yang berkontak langsung dengan sel granulosa, berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk suatu lapisan luar disebut sel teka (Sherwood, 2010).

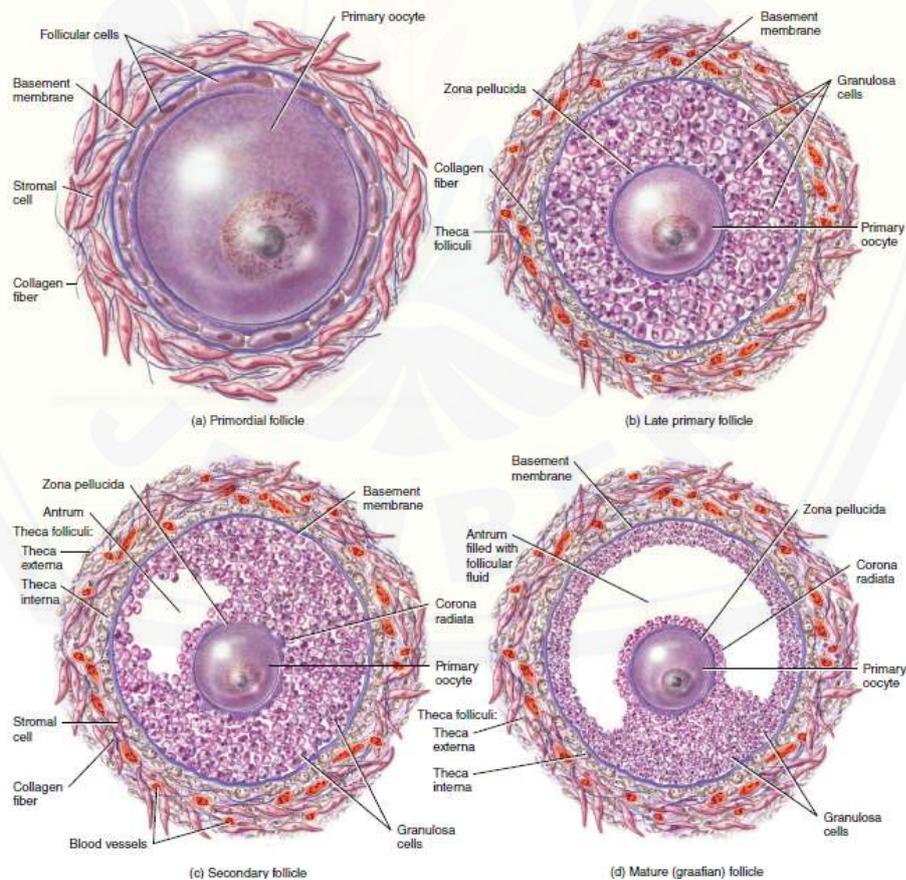
Folikel primer yang berkembang menyebabkan struktur folikel mengalami perubahan menjadi folikel sekunder yang distimulasi oleh FSH dan LH. FSH dan LH masing-masing akan berikatan dengan reseptor spesifik pada permukaan sel granulosa dan sel teka. Pengikatan yang terjadi antara hormon LH dan reseptornya akan merangsang pembentukan androgen. Sedangkan pengikatan yang terjadi antara FSH dan reseptornya pada sel-sel granulosa akan merangsang enzim aromatase untuk mengkonversi androgen menjadi hormon estrogen. Sel granulosa akan menghasilkan cairan folikular yang banyak mengandung hormon estrogen dan membentuk suatu rongga yang disebut antrum. Sedangkan sel teka berdiferensiasi menjadi dua lapis yaitu teka interna dan teka eksterna (Tortora dan Derrickson, 2014). Lapisan dalam yang tersusun atas sel-sel granulosa akan melingkupi zona pelusida dan melapisi oosit yang disebut korona radiata (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Folikel sekunder berkembang secara bertahap dan menjadi folikel matang (Folikel de Graaf). Folikel de Graaf adalah folikel yang telah mencapai perkembangan optimal dengan jumlah sel-sel granulosa yang semakin banyak dan siap untuk ovulasi. Ruang antrum folikel juga bertambah besar karena akumulasi hormon estrogen yang semakin meningkat. Oosit dikelilingi oleh zona pelusida dan korona radiata yang melekat pada dinding folikel melalui tangkai yang tersusun atas sel granulosa disebut kumulus ooforus (Sherwood, 2010). Tahapan perkembangan folikel ovarium dapat dilihat pada Gambar 2.1

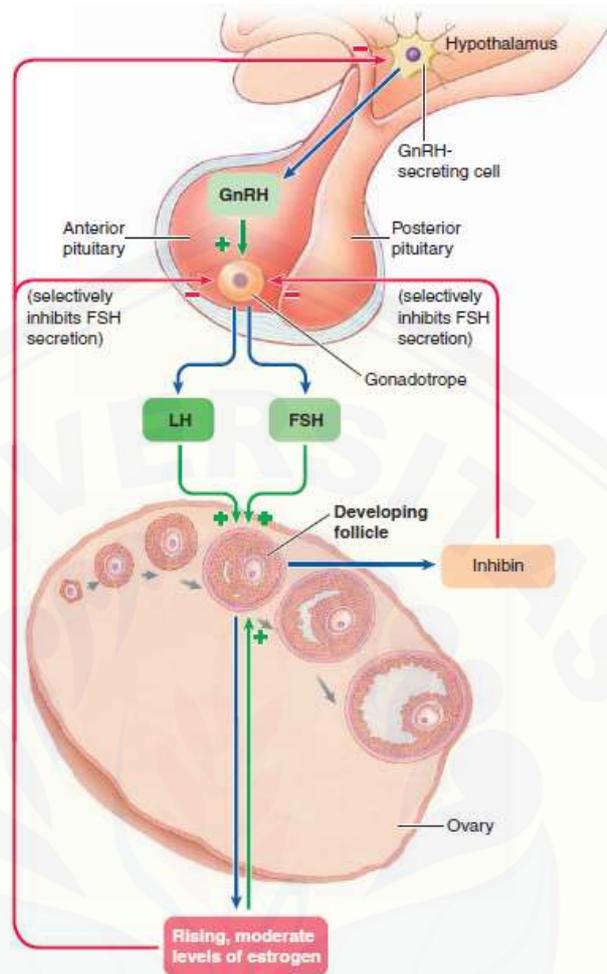
Pada saat folikel telah mencapai kematangan, peningkatan hormon estrogen akan memberikan umpan balik positif kepada hipofisis anterior untuk mensekresikan LH dan umpan balik negatif kepada hipofisis anterior untuk menghambat disekresikannya FSH. LH menginduksi terjadinya ovulasi berupa perubahan pada struktur dan biokimia dari dinding folikel yang mengakibatkan

pecahnya dan pengeluaran oosit dari dalam folikel yang dikelilingi oleh kumulus ooforus. Ovulasi menyebabkan oosit dan badan polar pertama meninggalkan ovarium dan memasuki tuba falopi untuk siap dibuahi (Sherwood, 2010). Umpan balik positif dan negatif selama perkembangan folikel dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Pasca ovulasi, dinding folikel menyusut membentuk korpus luteum. Perkembangan dari korpus luteum tergantung dari terjadinya fertilisasi dan kebuntingan atau tidak. Apabila terjadi fertilisasi maka korpus luteum akan bertambah ukurannya dan jika tidak terjadi fertilisasi, maka korpus luteum akan mengalami degenerasi (Hillier, 2001). Korpus luteum merupakan ruang folikuler berukuran besar yang berisi darah dan cairan limfa (Mastuti dan Ciptono, 2017). Korpus luteum juga mengandung banyak kolesterol, molekul prekursor steroid, dan lemak (Sherwood, 2010).



Gambar 2 1 Perkembangan folikel ovarium (Tortora dan Derrickson, 2014)



Gambar 2.2 Kinerja hormon selama perkembangan folikel ovarium (Sherwood, 2010)

## 2.2 Peran Hormon Estrogen terhadap Perkembangan Folikel dan Siklus Estrus

Hormon estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh sel granulosa dan sel teka ovarium. Sel teka akan menghasilkan androgen yang kemudian akan berdifusi ke dalam sel granulosa. Sel granulosa mengandung enzim aromatase yang dapat mengubah androgen menjadi estrogen. Berkembangnya folikel dalam ovarium menyebabkan hormon estrogen yang dihasilkan meningkat. Hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel granulosa, sebagian akan dikeluarkan ke dalam darah. Sebagian sisanya tetap berada di dalam folikel untuk membentuk cairan antrum dan merangsang proliferasi sel granulosa lebih lanjut (Sherwood, 2010).

Hormon estrogen pada organ reproduksi betina ditemukan dalam bentuk estradiol 17- $\beta$ , estron, dan estriol (Hiller, 1991). Hormon estrogen berperan dalam perkembangan organ reproduksi betina, proliferasi sel, dan siklus estrus (Guyton, 2006). Aktivitas hormon estrogen selama siklus estrus akan memicu proliferasi kelenjar endometrium uterus sehingga meningkatkan jumlah kelenjar endometrium dan tebal endometrium (Cooke *et al.*, 1998). Hormon estrogen juga mempengaruhi proliferasi epitel vagina. Siklus estrus pada mencit dapat diketahui melalui perubahan epitel vagina (Goldman *et al.*, 2007). Selama siklus estrus kadar hormon estrogen akan mengalami peningkatan dan penurunan. Pada fase proestrus sampai fase estrus hormon estrogen mengalami peningkatan, sedangkan pada fase metestrus dan diestrus hormon estrogen akan mengalami penurunan.

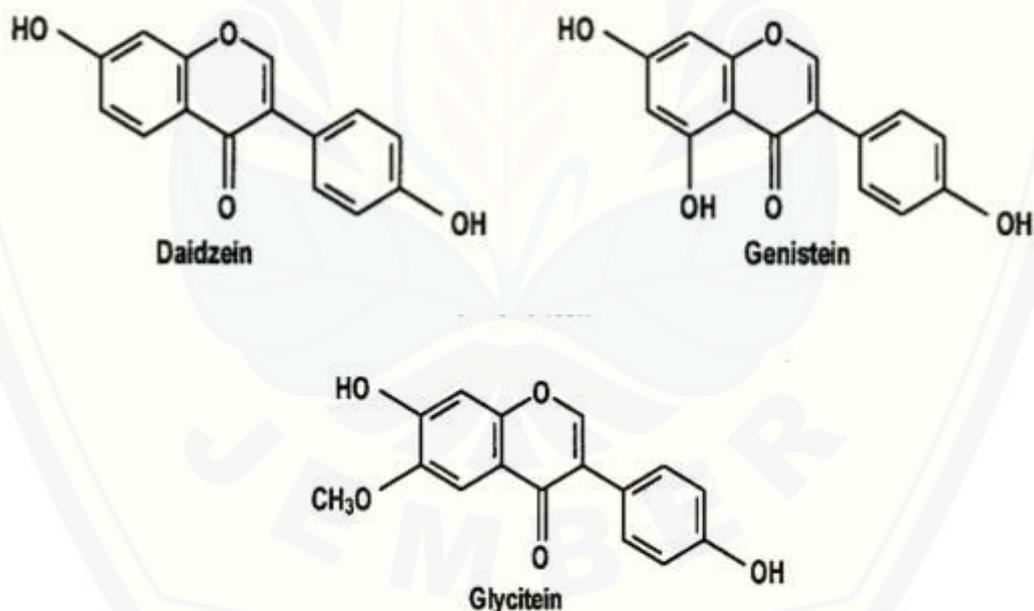
Pada fase proestrus terjadi pertumbuhan dan perkembangan folikel dibawah pengaruh FSH. Folikel yang tumbuh dan mencapai kematangan akan mensekresikan hormon estrogen. Pada fase ini mulai muncul birahi untuk melakukan kawin, tapi hewan betina belum mau menerima pejantan untuk melakukan kopulasi. Pada fase estrus hormon estrogen meningkat. Saluran reproduksi termasuk mukosa vagina mulai mengalami vaskularisasi sehingga sel epitel saluran reproduksi mulai berproliferasi. Kadar estrogen dan suplai darah ke vagina yang meningkat menyebabkan sel epitel vagina mengalami pembelahan, proses penandukan (kornifikasi), dan sekresi lendir (Toelihere, 1981). Selain itu, peningkatan hormon estrogen akan merangsang disekresikannya LH untuk terjadi ovulasi dan terbentuk korpus luteum. Pada fase ini mencit betina siap untuk kopulasi. Pada fase metestrus, kadar estrogen menurun yang menyebabkan vaskularisasi epitel vagina menurun sehingga terjadi pelepasan epitel vagina dan leukosit. Pada fase diestrus, kadar estrogen rendah yang menyebabkan vagina menipis dan leukosit jumlahnya bertambah (Turner dan Bagnara, 1987).

### 2.3 Kandungan Isoflavon Kedelai Hitam

Kedelai hitam merupakan tanaman dari famili *Leguminosae* yang mengandung senyawa isoflavon (Wardani dan Ika, 2014). Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang mengandung daidzein, genistein, dan glycitein

(Nurrahman, 2015). Kedelai hitam mempunyai kandungan isoflavon dan flavonoid lebih tinggi dibandingkan kedelai kuning dengan senyawa flavonoid 5 kali lebih banyak dibandingkan kedelai kuning yaitu 2,57 mg dan 0,50 mg (Xu dan Chang, 2007).

Daidzein dan genestein merupakan isoflavon yang dapat berperan sebagai fitoestrogen. Komponen tersebut memiliki struktur yang mirip dengan estrogen endogen sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen di dalam tubuh (Mazur, 1998). Reseptor estrogen ada dua macam yaitu reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ) dan reseptor estrogen beta (ER- $\beta$ ). Reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ) terdapat pada organ uterus, testis, ginjal, dan epididimis sedangkan reseptor estrogen beta (ER- $\beta$ ) terdapat di ovarium, prostat, paru-paru, kandung kemih, dan tulang (Ganong, 2005). Struktur molekul daidzein dan genistein dapat dilihat pada Gambar 2.3



Gambar 2 3 Struktur Kimia Daidzein, Genistein, dan Glycitein (Nakamura *et al.*, 2001)

Isoflavon yang bersifat estrogenik dapat menjadi alternatif jika terjadi defisiensi estrogen. Pemberian fitoestrogen berupa isoflavon menyebabkan kadar estrogen dalam darah meningkat sehingga memicu perkembangan folikel yang ditunjukkan dengan bertambahnya jumlah folikel yang matang. Hal ini berkaitan dengan masuknya senyawa fitoestrogen yang dapat meningkatkan proliferasi sel

sehingga folikel berkembang dan jumlah korpus luteum bertambah (Musahilah, 2010). Penelitian Adayy *et al.*, (2013) menyatakan bahwa pemberian fitoestrogen dari ekstrak campuran alfafa (*Medicago sativa*) dan sage (*Salvia officinalis*) yang mengandung isoflavon pada mencit dengan dosis 100 dan 200 mg/kg/hari dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium dan korpus luteum.

Pemberian isoflavon juga dapat memperpanjang fase proestrus dan fase estrus. Penelitian Prasetyo (2016) menyatakan bahwa, pemberian infusa buah adas yang mengandung fitoestrogen dengan dosis 292 mg/100 g BB pada tikus ovariektomi dapat memperpanjang fase proestrus dan estrus. Aktivitas isoflavon selama siklus estrus akan memicu proliferasi endometrium dan miometrium serta meningkatkan jumlah kelenjar uterus (Primiani, 2015). Isoflavon juga akan memberikan pengaruh pada epitel vagina sehingga terjadi proliferasi dan kornifikasi sel epitel vagina. Hal ini terlihat dengan adanya pemanjangan fase proestrus dan fase estrus. Pada fase proestrus, sel epitel vagina mengalami proliferasi sedangkan pada fase estrus terjadi kornifikasi (Safrida, 2008).

#### **2.4 Hipotesis**

Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium dan memperpanjang siklus estrus mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C ovariektomi unilateral.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Zoologi dan Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, pada bulan Oktober 2017 sampai bulan Februari 2018.

#### 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 dan penutup dari ram kawat besi, botol minum mencit, timbangan analitik, jarum sonde, papan bedah, *sput injection* (Terumo Syringe 1cc/ml) 0,45 x 13 mm, *sput injection* (Terumo Syringe 3 ml) 0,65 x 32 mm, eskavator, *hecting set*, silet, jarum sutura no. 2, beaker glass (1000 ml, 600 ml, 200 ml), gelas ukur 100 ml, botol *scott* (1000 ml dan 500 ml), corong plastik kecil, pipet tetes, spatula, cawan porselen 75 cc, *grinder*, saringan tepung 60 *mesh*, *rotary evaporator*, *waterbath*, baki *stainless steel*, sendok, cup ekstrak kecil, botol, mikroskop (*Olympus*), optilab, *staining jar*, flakon, oven (*Incucell*), dan *hand counter*.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari mencit (*Mus musculus* L.) betina strain Balb/C umur 2 bulan, pakan pellet BR1, sekam padi, serbuk gergaji kayu, aquades steril, *ketamine* 10% dan *xyla* (Keppro Holland) benang silk nomor 3, benang *cat gut* nomor 3, betadine, paracetamol, 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*, dan larutan fiksatif PBS formalin.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada setiap kelompok perlakuan. Metode ini bertujuan untuk menguji pengaruh perlakuan pada kelompok uji yang dibandingkan dengan kelompok kontrol. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak tepung kedelai hitam. Sedangkan variabel terikatnya adalah jumlah folikel, jumlah korpus luteum, dan siklus estrus mencit ovariektomi unilateral.

Pada penelitian ini digunakan 24 ekor mencit betina (*Mus musculus*) strain Balb/c. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok dengan pengulangan sebanyak 6 kali pada masing-masing kelompok dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

Kontrol Negatif (K-) : Kelompok mencit tanpa ovariektomi unilateral (ULO) dan tanpa ekstrak tepung kedelai hitam.

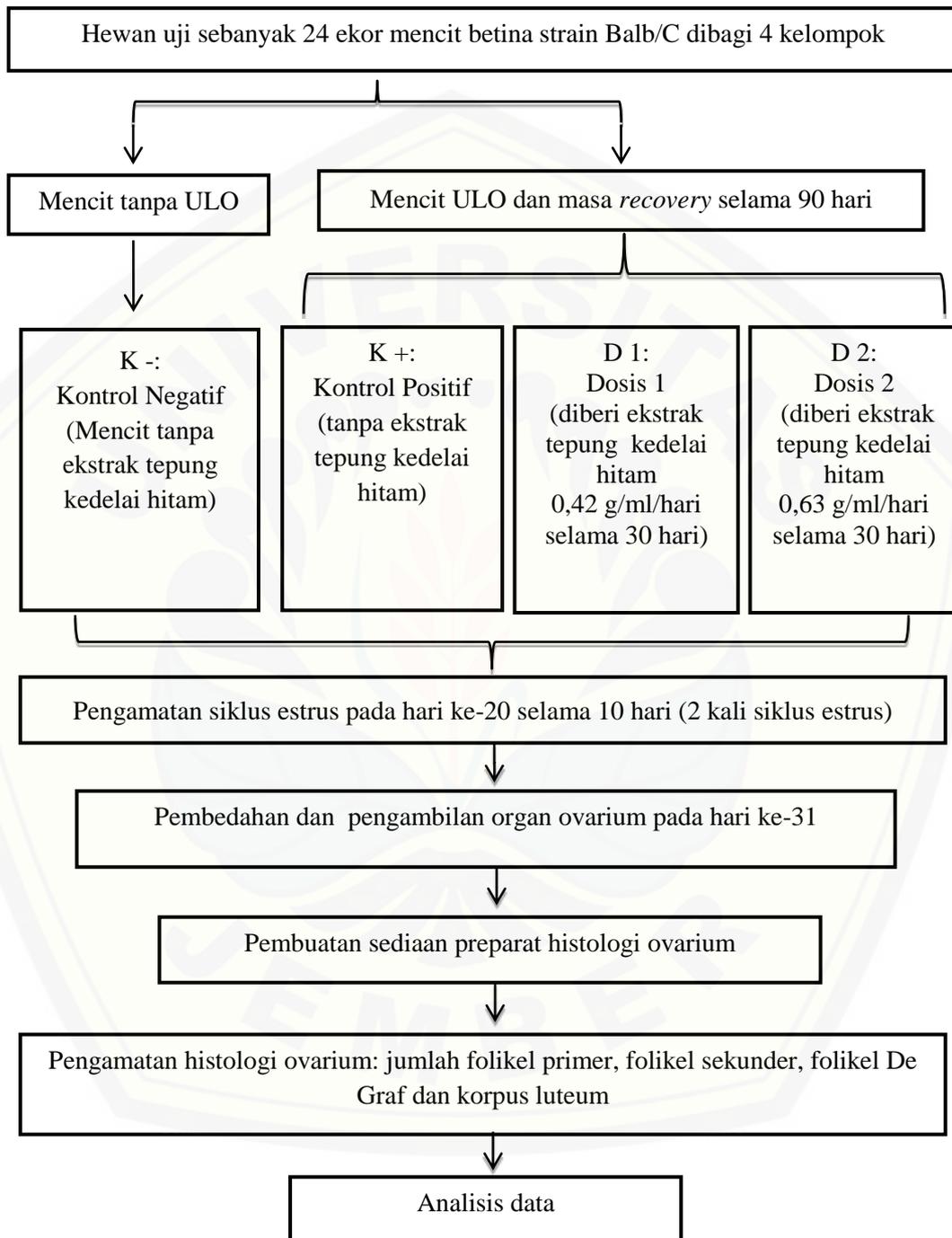
Kontrol Positif (K+) : Kelompok mencit ovariektomi unilateral (ULO) tanpa ekstrak tepung kedelai hitam.

Dosis 1 (D 1) : Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral (ULO) yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,42 g/ml/hari selama 30 hari (Ulfa, 2016).

Dosis 2 (D 2) : Kelompok perlakuan mencit ovariektomi unilateral (ULO) yang diberi ekstrak tepung kedelai hitam dengan dosis 0,63 g/ml/hari selama 30 hari (Ulfa, 2016).

### 3.4 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3. 1 Alur Kegiatan Penelitian

### 3.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu persiapan hewan uji, pembuatan ekstrak tepung kedelai hitam, preparasi hewan uji ovariektomi unilateral, perlakuan hewan uji, pengamatan siklus estrus, pembuatan preparat histologi ovarium, dan pengamatan.

#### 3.5.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C umur 2 bulan. Mencit ditempatkan dalam kandang berukuran 34 cm x 25 cm x 12 cm dengan alas sekam padi dan serbuk gergaji kayu yang ditutup kawat. Mencit diberi pakan standar berupa pellet BR1 dan minum aquades steril.

#### 3.5.2 Preparasi Ovariektomi Unilateral Mencit

Ovariektomi unilateral adalah proses pengambilan salah satu ovarium. Ovariektomi dilakukan dengan cara membius mencit menggunakan *ketamine 10%* dan *xyla* dengan perbandingan 1:1 (dosis 0,05 ml). Mencit diletakkan di atas papan bedah dengan posisi terlentang. Bagian medial perut diolesi dengan air sabun antibakteri dan dicukur sampai bersih menggunakan silet. Selanjutnya diolesi *betadine* dan dilakukan pembedahan pada kulit bagian luar dengan lebar 1,5 cm dan kulit bagian dalam 1 cm. Organ reproduksi dikeluarkan untuk mencari salah satu ovarium kemudian dijepit dengan klem arteri dan diikat bagian ujung *oviduct* dengan silk, ovarium sebelah kanan dipotong dengan gunting *matzenbaum*. Organ dalam yang telah dikeluarkan direposisi dengan memberikan 0,5 ml larutan *Sodium Chloride 0,9 %* (Ulfa, 2016).

Proses penutupan luka bedah dilakukan dengan cara menjahit bagian *muskulus oblikus abdominis internus* menggunakan benang *cut gut chromic* ukuran 3.0 sedangkan untuk menjahit *muskulus oblikus abdominis eksternus* menggunakan benang silk ukuran 3.0 dan jarum sutura. Bagian abdomen yang dibedah kemudian diolesi dengan *betadine* dan dilakukan injeksi antibiotik.

Selama masa penyembuhan luka dilakukan pemberian parasetamol selama 1 minggu (Ulfa, 2016).

### 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Tepung Kedelai Hitam

Kedelai hitam ditumbuk kasar dan dioven pada suhu 40-45°C selama 2-3 hari. Kedelai hitam yang sudah kering digiling dengan menggunakan grinder sampai berubah menjadi tepung. Tepung kedelai hitam diayak dengan ayakan 60 mesh untuk mendapatkan tekstur yang halus. Kemudian tepung dilarutkan dalam alkohol 70% dengan perbandingan 1:4 (200 gr tepung: 800 ml alkohol). Larutan dihomogenkan dan dimaserasi selama 2 x 24 jam untuk memisahkan supernatan dan pelet. Supernatan disaring dengan kain saring dan kertas saring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat tanpa alkohol, kemudian filtrat tanpa alkohol dipanaskan di *waterbath* selama  $\pm$  8 jam untuk mendapatkan *crude extract* dalam bentuk pasta (Ulfa, 2016).

### 3.5.4 Perlakuan Hewan Uji

Perlakuan yang dilakukan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak tepung kedelai hitam yang diberikan secara oral kepada kelompok perlakuan dengan dosis 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari. Pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dimulai pada hari ke-91 pasca ovariektomi selama 30 hari. Ekstrak kedelai hitam diberikan sebanyak 1 ml sesuai dengan dosis yang ditentukan yaitu 0,42 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari. Penentuan dosis ekstrak tepung kedelai hitam yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran A.

### 3.5.5 Pengamatan Periode Siklus Estrus

Pengamatan siklus estrus dilakukan dengan pengambilan sediaan apusan vagina yang dilakukan 3 kali dalam sehari yaitu pagi hari (pukul 08.00 WIB), siang hari (pukul 14.00 WIB) dan sore hari (pukul 16.00 WIB) selama 10 hari. Pengambilan apusan vagina dilakukan menggunakan tusuk gigi yang berujung tumpul, kemudian dioleskan pada dinding vagina dengan cara diputar 360°. Hasil

ulasan dioleskan pada gelas objek secara merata dan diwarnai dengan *Methylen Blue*. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100X. Penentuan fase siklus estrus dilakukan dengan pengamatan berdasarkan perbandingan jenis sel epitel berinti, epitel menanduk (kornifikasi), dan leukosit secara kualitatif. Penentuan ini dapat dilihat pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Perbandingan jenis sel pada preparat apusan vagina

Fase Siklus Estrus	Apusan Vagina
Proestrus	Sel epitel berinti
Estrus	Sel kornifikasi
Metestrus	Sel kornifikasi dan leukosit
Diestrus	Leukosit dan sel epitel berinti

Sumber: Nalbandov, 1999.

### 3.5.6 Tahap Pembuatan Preparat Histologi

Metode yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi ovarium adalah metode parafin dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin*. Metode parafin dilakukan dengan tahapan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *infiltrasi*, *embedding*, *section*, *affixing* dan *mounting* (Suntoro, 1983). Prosedur pembuatan preparat histologi ovarium sebagai berikut:

#### a Fiksasi, Dehidrasi, dan *Clearing*

Organ ovarium yang telah diambil dicuci dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan dalam flakon berisi larutan fiksatif BPS formalin 10% selama 24 jam. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai 30%-95% masing-masing 30 menit dan dimasukkan ke dalam alkohol absolut selama 1-2 jam. Proses selanjutnya adalah *clearing*, organ ovarium dijernihkan dengan xylol selama semalam (*overnight*).

#### b *Infiltrasi* dan *Embedding* (penanaman)

Infiltrasi parafin menggunakan parafin yang telah dicairkan di dalam oven. Infiltrasi dilakukan secara bertingkat menggunakan xylol- parafin 1:1 selama 30 menit kemudian menggunakan xylol-parafin dengan perbandingan 1:2

dan 1:3, selanjutnya dimasukkan dalam parafin I,II dan III masing-masing selama 30 menit. Infiltrasi parafin dilakukan pada suhu 55-56°C. Setelah infiltrasi, dilakukan penanaman organ pada blok parafin.

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

Hasil *embedding* direkatkan pada holder dengan menggunakan skalpel dan bunsen. Organ ovarium disayat melintang menggunakan *rotary microtom* dengan ketebalan 6 µm. Sayatan direkatkan (*affixing*) pada gelas objek yang telah dilapisi perekat gliserin dan albumin.

d Pewarnaan (*Staining*)

Langkah awal pewarnaan adalah proses deparafinasi menggunakan xylol selama 15 menit. Langkah selanjutnya dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolut, alkohol 95%-70%, aquades masing-masing 2 menit kemudian dilakukan pewarnaan dengan *Haematoxylin* selama 2-3 menit, kemudian dicuci air mengalir. Slide dimasukkan kembali dalam alkohol bertingkat dari 20% hingga 70%, setelah itu dilakukan pewarnaan Eosin selama 10 menit dilanjutkan alkohol bertingkat hingga Xylol I dan II masing-masing selama 2 menit.

e Penutupan (*Mounting*)

Slide 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 Pengamatan pada Penelitian

a Jumlah Folikel dan Korpus Luteum

Perhitungan jumlah folikel dilakukan dengan menghitung folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff, dan korpus luteum pada preparat histologi ovarium masing-masing kelompok dengan tiga kali pengulangan. Pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dan optilab.

b Periode Siklus Estrus

Siklus estrus diperoleh dari pengamatan fase proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus sampai fase proestrus kembali berdasarkan perbandingan adanya sel

epitel berinti, epitel menanduk (kornifikasi), dan leukosit. Pengamatan dilakukan selama 2 kali siklus estrus.

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah jumlah folikel ovarium dan lama siklus estrus kemudian dianalisis menggunakan program SPSS 15.0 *for Windows* dengan taraf kepercayaan 95% atau  $\alpha=0,05$ . Berdasarkan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, diperoleh hasil distribusi data yang tidak normal ( $p<0,05$ ), sehingga digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan antara dua kelompok atau lebih variabel independen pada variabel depende. Selanjutnya untuk mengetahui beda nyata antar kelompok uji dilakukan analisis non parametrik *Wilcoxon* (Steel dan Torrie, 1993).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian ekstrak tepung kedelai hitam dosis 0,42 g/ml/hari (D1) dan dosis 0,63 g/ml/hari (D2) pada mencit (*Mus musculus*) betina strain Balb/C ovariektomi unilateral dapat meningkatkan jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel de Graff, korpus luteum dan memperpanjang periode siklus estrus mencit sehingga mengembalikan pada kondisi normal.

### 5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengetahui potensi ekstrak tepung kedelai hitam sebagai alternatif estrogen eksogen dalam meningkatkan estrogen endogen pada hewan model pasca ovariektomi. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan pengukuran kadar estrogen endogen pada hewan model ovariektomi unilateral.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Alagwu, E. A. dan R. O. Nneli. 2005. Effect of Ovariectomy on the Levels of Plasma Sex Hormones in Albino Rats. *Nigerian Journal of Physiological Science*. 20 (1-2): 90-94.
- Aaday, M. H., S. S. A. Dujaily, dan F. K. Khazzal. 2013. Effect of Aqueous Extract of *Medicago sativa* and *Salvia officinalis* Mixture on Hormonal, Ovarian and Uterine Parameters in Mature Female Mice. *J. Mater. Environ.* 4(4): 424-433.
- Albertino, N. 2015. Pemberian Infusa Biji Adas (*Foeniculum vulgare* Mill) Terhadap Perkembangan Uterus Tikus Putih Produktif Dan Premenopause. *Skripsi*. Bogor: Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Anwar, R. 2005. *Morfologi dan Fungsi Ovarium*. Bandung: Fakultas Kedokteran UNPAD.
- Baker, D. E. J., Lindsey J. R., dan Weisborth S. H. 1980. *The Laboratory Rat*. Vol II. Research Applications. London: Academic Press Inc
- Binkley S. A. 1995. *Endocrinology*. New York: Harper Collins College Publisher.
- Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Lubahn, D. B. dan Cunha, G. R. 1998. Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor- $\alpha$  knockout mouse. *Biology of Reproduction*. 59(3): 470-475.
- Dewantiningrum, J. 2008. Perbedaan Pengaruh Clomiphene Citrate dan Letrozole terhadap Folikel, Endometrium, dan Lendir Serviks. *Tesis*. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis I Universitas Diponegoro.
- Ganong, F. W. 2005. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Alih Bahasa M. Djauhari Widjajakusumah. Jakarta: EGC.

- Goldman, J. M., Murr, A. S., dan Cooper, R. L. 2007. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80(1): 84-97.
- Goodman, H. M. 2003. *Basic Medical Endokrinology: Chapter 12 Hormonal Control of Reproduction in the Female: The Menstrual Cycle.* London: Academic Pr.
- Gruber, C. J. M. D. W. Tschugguel, M. D. C. Schneeberger, dan J. C. Huber. 2002. Production and Actions of Estrogen. *The New England Journal of Medicine.* 346(5): 340-352.
- Guyton, A. C. 2006. *Fisiologi Kedokteran bagian III.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hafez, E. S. E., Jainudeen M.R., dan Rosnina Y. 2000. Hormones, Growth Factors and Reproduction. Di dalam: *Reproduction in Farm Animals.* Ed. ke-3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 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. *Eksperimental Biology and Medicine.* 222(1): 78-84.
- Hillier, S. G. 2001. Gonadotropic Control of Ovarian Follicular Growth and Development. *J. Molecular and Cellular Endocrinology.* 179: 39-46.
- Hunter, R. H. F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik.* Alih bahasa D.K. Harya Putra. Bandung: Institut Teknologi Bandung Press.
- Ismudiono, M. S. 1996. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak.* Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Junqueira, L.C., J. Carneiro, dan R.O. Kelley. J. 1991. *Histologi Dasar (Basic Histology).* Edisi V. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- Kuiper, G.G.J.M., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe., P.T. Van der Saag, B. Van der Burg, dan J. A. Gustfssn. 1998. Interaction of Estrogenic Chemical and Phytoestrogen with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 139: 4252-4263.
- Mastuti, R. Q. D. Dan Ciptono. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris*, L.) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putih (*Rattus norvegicus*, L.). *Jurnal Prodi Biologi*. 6(3): 131-141.
- Mazur, W. M., J. A. Duke, K. Wahala, S. Rasku, dan H. Adlercreutz. 1998. Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritiol and Health Aspect in Humans. *Research Communications*. 9: 193-200.
- Meredith, S., G. Dudenhoefter, R. L. Butcher, S. P. Lerner, dan T. Walls. 1992. Unilateral Ovariectomy Increases Loss of Primordial Follicles and is Associated with Increased Metestrus Concentration of Follicle-Stimulating Hormone in Old Rats. *Biology of Reproduction*. 47: 162-168.
- Morán, C., L. Morales, U. Quiróz, dan R. Dominguez. 2000. Effects of Unilateral or Bilateral Superior Ovarian Nerve Section in Infantile Rats on Follicular Growth. *Journal of Endocrinology*. 166: 205-211.
- Muhamud, N. A. B. 2013. Peran Pemberian Ekstrak Tempe Terhadap Organ Ovarium dan Uterus Tikus Betina Prapubertas. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Nakamura, Y., A. Kaihara, K. Yoshii, Y. Tsumura, S. Ishimitsu, dan Y. Tonogai. 2001. Content dan Composition of Isoflavonoids in Mature or Immature Beans and Bean Sprouts Consumed in Japan. *Journal of Health Science*. 47(4) :394-406.
- Nalbandov, A. V. 1999. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas*. Terjemahan Sumaryono, K. Jakarta: UI Press.

- Nurrahman, N., 2015. Evaluasi Komposisi Zat Gizi dan Senyawa Antioksidan Kedelai Hitam dan Kedelai Kuning. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 4(3): 89- 93.
- Peppler, R. D. 1971. Effects of Unilateral Ovariectomy on Follicular Development and Ovulation in Cycling, Aged Rats. *J. Anat.* 132: 423-428.
- Prasetyo, D. 2016. Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Setelah Pemberian Infusa Buah Adas (*Foeniculum vulgare* Mill). *Skripsi*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan IPB.
- Primiani, C. N. 2005. The Phytoestrogenic Potential of Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*) on Ovarian and Uterine Tissue Structure of Premenopausal Mice. *Biology, Medicine, and Natural Product Chemistry*. 4(1): 4-9.
- Rul, A. S., S. K. Soejono, E. Meiyanto, dan M. S. H. Wahyuningsih. 2016. Efek Kurkumin terhadap estradiol dan Ekspresi Reseptor Estrogen  $\beta$  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*. Institut Pertanian Bogor.
- Salisbury, G. W. Dan N. L. Van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. R. Djanuar, penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari: *The Reproductive System of the Cow*.
- Steel, R. Dan Torrie, J. 1993. *Principles and Procedures of Statistics*. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Sherwood, L. 2010. *Fisiologi Manusia: Dari Sel ke Sistem Edisi 6*. Jakarta: EGC.
- Suhargo, L. 2005. Efek Estrogenik Ekstrak Daun Handeuleum (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) Pada Histologi Uterus Mencit Betina Ovariectomi. *Berk. Penel. Hayati*. 10: 107-110.

- Suntoro, S. H. 1983. *Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia)*. Jakarta: Bhratara Karya Aksara.
- Suprihatin. 2008. Optimalisasi Kinerja Reproduksi Tikus Betina Setelah Pemberian Tepung Kedelai dan Tepung Tempe pada Usia Prapubertas. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere, M. R. 1981. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Tortora, G. J. dan B. Derrickson. 2014. *Principles of Anatomy and Physiology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Turner, C.D. dan Bagnara, J.T. 1988. *Endokrinologi Umum*. Ed. ke-6. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Ulfa, Y.M. 2016. Efek Ekstrak Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) terhadap Struktur Histologi Uterus Mencit (*Mus musculus*) Strain Swiss Webster Ovariektomi Unilateral. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Wardani, A. K. dan I. R. Wardani. 2014. Eksplorasi Potensi Kedelai Hitam Untuk Produksi Minuman Fungsional sebagai Upaya Meningkatkan Kesehatan Masyarakat. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(4): 58-67.
- Xu, B. J. dan 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 Ekstrak Tepung Kedelai Hitam**

- Penentuan dosis dihitung berdasarkan penelitian Safrida (2008), yaitu 10 gram berat kering (BK) / 100 gram berat badan (BB) tikus.

- Konversi pasta dari berat kering tempe kedelai.

Berat kering tempe	:	Berat Pasta
2034,8 gram	:	175,6 gram
1 gram	:	0,086 gram

10 gram BK/100 gram BB tikus

10 gram BK/100 gram BB = 0,1 gram BK/ gram tikus

- Rata-rata BB tikus = 200 gram

$0,1 \times 200 = 20$  gram BK/200 gram BB mencit

- Konvers 200 gram tikus  $\rightarrow$  20 gram BB mencit = 0,14.

$20 \times 0,14 = 2,8$  gram

- Dikonversi ke pasta.

$2,8 \times 0,086 = 0,24$  gram pasta/ 20 gram BB mencit

$0,24/20 = 0,012$  gram pasta/ gram BB mencit

- Rata-rata BB mencit perlakuan = 35 gram

$0,012 \times 35 = 0,42$  gram

$0,018 \times 35 = 0,63$  gram (Ulfa, 2016).

## B Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon* Menunjukkan Rata-Rata dan Rangking Folikel Primer, Folikel Sekunder, Folikel de Graff, dan Korpus Luteum

### 1 Rata-Rata dan Rangking Folikel Primer Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon*

#### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Folikel Primer	24	13,38	4,547	3	24
Folikel Sekunder	24	7,71	3,155	0	14
Folikel de Graff	24	1,17	,917	0	3
Korpus Luteum	24	1,54	1,532	0	5
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

#### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Folikel Primer	Kontrol Negatif	6	13,67
	Kontrol Positif	6	4,25
	Dosis 1	6	15,33
	Dosis 2	6	16,75
	Total	24	

#### Test Statistics (a,b)

	Folikel Primer
Chi-Square	11,567
df	3
Asymp. Sig.	0,009

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

#### Test Statistics (c)

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-2,032(a)	-,105(b)	-,680(b)	-2,032(b)	-2,207(b)	-,405(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,042	0,916	0,496	0,042	0,027	0,686

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

2 Rata-Rata dan Ranging Folikel Sekunder Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon*

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Folikel Primer	24	13,38	4,547	3	24
Folikel Sekunder	24	7,71	3,155	0	14
Folikel de Graff	24	1,17	,917	0	3
Korpus Luteum	24	1,54	1,532	0	5
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
Folikel Sekunder	Kontrol Negatif	6	13,67
	Kontrol Positif	6	4,75
	Dosis 1	6	14,75
	Dosis 2	6	16,83
	Total	24	

**Test Statistics (a,b)**

	Folikel Sekunder
Chi-Square	10,367
df	3
Asymp. Sig.	0,016

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

**Test Statistics (c)**

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-2,207(a)	-,315(b)	-,966(b)	-2,003(b)	-2,214(b)	-,108(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,027	0,752	0,334	0,045	0,027	0,914

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

### 3 Rata-Rata dan Ranging Folikel De Graff Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon*

#### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Folikel Primer	24	13,38	4,547	3	24
Folikel Sekunder	24	7,71	3,155	0	14
Folikel de Graff	24	1,17	,917	0	3
Korpus Luteum	24	1,54	1,532	0	5
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

#### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Folikel De Graff	Kontrol Negatif	6	13,83
	Kontrol Positif	6	5,17
	Dosis 1	6	14,67
	Dosis 2	6	16,33
	Total	24	

#### Test Statistics (a,b)

	Folikel De Graff
Chi-Square	10,002
df	3
Asymp. Sig.	0,019

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

#### Test Statistics (c)

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-2,070(a)	-,447(b)	-,707(b)	-2,070(b)	-2,121(b)	-,272(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,038	0,655	0,480	0,038	0,034	0,785

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

#### 4 Rata-Rata dan Rangkings Korpus Luteum Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon*

##### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Folikel Primer	24	13,38	4,547	3	24
Folikel Sekunder	24	7,71	3,155	0	14
Folikel de Graff	24	1,17	,917	0	3
Korpus Luteum	24	1,54	1,532	0	5
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

##### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
Korpus Luteum	1	6	13,92
	2	6	5,58
	3	6	14,50
	4	6	16,00
	Total	24	

##### Test Statistics (a,b)

	Korpus Luteum
Chi-Square	8,458
df	3
Asymp. Sig.	0,037

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

##### Test Statistics (c)

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-1,841(a)	-,184(b)	-,557(b)	-2,032(b)	-2,032(b)	-,378(b)
Asymp. Sig. (2- tailed)	0,066	0,854	0,577	0,042	0,042	0,705

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c The sum of negative ranks equals the sum of positive ranks.

d Wilcoxon Signed Ranks Test

**C Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon* Menunjukkan Rata-Rata dan Rangkings terhadap Periode Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*) Strain Balb/C Ovariectomi Unilateral**

1 Rata-Rata dan Rangkings Siklus Pertama Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon*

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Panjang Siklus Pertama	24	109,17	23,249	52	140
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
Periode Siklus Pertama	Kontrol Negatif	6	12,33
	Kontrol Positif	6	4,67
	Dosis 1	6	19,17
	Dosis 2	6	13,83
	Total	24	

**Test Statistics (a,b)**

	Periode Siklus Pertama
Chi-Square	13,482
df	3
Asymp. Sig.	0,004

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

**Test Statistics (c)**

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-2,207(a)	-,944(b)	-,744(a)	-1,782(b)	-1,787(b)	-,944(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,027	0,042	0,832	0,028	0,046	0,141

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test

2 Rata-Rata dan Rangkingsiklus Kedua Hasil Analisis *Kruskal Wallis-Wilcoxon***Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Panjang Siklus Estrus Kedua	24	109,67	20,291	52	140
Perlakuan	24	2,50	1,142	1	4

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
Periode Siklus Estrus Kedua	Kontrol Negatif	6	18,00
	Kontrol Positif	6	6,08
	Dosis 1	6	11,83
	Dosis 2	6	14,08
	Total	24	

**Test Statistics (a,b)**

	Periode Siklus Estrus Kedua
Chi-Square	9,318
df	3
Asymp. Sig.	0,025

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Perlakuan

**Test Statistics(c)**

	Kontrol Positif - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Negatif	Dosis 2 - Kontrol Negatif	Dosis 1 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Kontrol Positif	Dosis 2 - Dosis 1
Z	-1,997(a)	-2,032(a)	-,106(a)	-1,761(b)	-2,207(b)	-1,604(b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,046	0,039	0,527	0,046	0,027	0,461

a Based on positive ranks.

b Based on negative ranks.

c Wilcoxon Signed Ranks Test