



**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KETEBALAN  
KULIT MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA  
UNILATERAL OVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Isna Kurotul Akyun**  
**NIM 151810401037**

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



**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KETEBALAN  
KULIT MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA  
UNILATERAL OVARIEKTOMI**

**SKRIPSI**

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

**Oleh:**

**Isna Kurotul Akyun  
NIM 151810401037**

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

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Alm. Abdussalam dan Ibunda Laspukyati yang memberikan kasih sayang, do'a, serta semangat dengan tidak pernah lelah mendidik saya untuk selalu belajar, menghargai, beribadah, dan berdo'a;
2. kakak saya Ulum Istiqomah dan adik saya Ahmad Nur Kholis Amir Su'ud, yang selalu memberikan motivasi dan doa kepada saya;
3. Bapak ibu guru TK Walisongo, SDN Tegalbang 3, SMPN 3 Tuban dan SMAN 5 Tuban telah memberikan ilmu serta bimbingannya dengan penuh kesabaran;
4. Almater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

"Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan."

(QS. Al-Insyirah: 5-6)<sup>\*)</sup>

“Menuntut ilmu adalah taqwa, menyampaikan ilmu adalah ibadah, mengulang-ulang ilmu adalah dzikir, dan mencari ilmu adalah jihad”

(Imam Al-Ghazali)<sup>\*\*)</sup>

---

\*) Departemen Agama. 1974. Al Qur'an dan Terjemahannya. Jakarta: PT. Bumi Restu.

\*\*\*) Imam Al-Ghazali

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama :Isna Kurotul Akyun

NIM :151810401037

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Etanol Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) Terhadap Ketebalan Kulit Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Unilateral Ovariectomi" adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri 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, 18 Juni 2019

Yang Menyatakan,

Isna Kurotul Akyun

NIM 151810401037

**SKRIPSI**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KEDELAI HITAM  
(*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) TERHADAP KETEBALAN  
KULIT MENCIT (*Mus musculus* L.) PASCA  
UNILATERAL OVARIEKTOMI**

Oleh:

Isna Kurotul Akyun

NIM 151810401037

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Susantin Fajariyah, M.Si.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Pengaruh Ekstrak Etanol Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) Terhadap Ketebalan Kulit Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Unilateral Ovariectomi**”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dra. Mahriani, M.Si  
NIP 195703151987022001

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si.  
NIP 196411051989022001

Anggota I,

Anggota II,

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

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd  
NIP 195805281988021002

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP 196102041987111001

## RINGKASAN

**Pengaruh Ekstrak Etanol Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc) Terhadap Ketebalan Kulit Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Unilateral Ovariectomi**; Isna Kurotul Akyun; 2019: 38 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Ovariectomi merupakan proses pengambilan ovarium pada organ reproduksi betina dan mengakibatkan defisiensi estrogen. Defisiensi estrogen menyebabkan penurunan jumlah keratinosit pada epidermis dan kolagen dalam dermis, sehingga akan mempengaruhi ketebalan kulit. Upaya yang dapat dilakukan dalam menanggulangi defisiensi estrogen adalah pemberian senyawa fitoestrogen. Tumbuhan yang mengandung banyak fitoestrogen antara lain kedelai hitam (*Glycin soja*). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat berupa informasi ilmiah mengenai potensi kedelai hitam (*Glycine soja*) sebagai sumber estrogen eksogen alami yang dapat dijadikan sebagai alternatif terapi hormon estrogen pada wanita menopause.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan hewan uji berupa mencit strain Balb/C sebanyak 24 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol negatif (mencit tanpa unilateral ovariectomi, tanpa ekstrak kedelai hitam), kontrol positif (mencit unilateral ovariectomi, tanpa ekstrak etanol kedelai hitam), kelompok D1 (mencit unilateral ovariectomi, pemberian ekstrak kedelai hitam dosis 0,31g/ml/hari), dan kelompok D2 (mencit unilateral ovariectomi, pemberian ekstrak kedelai hitam dosis 0,63 g/ml/hari). Pemberian ekstrak kedelai hitam dilakukan secara *gavage* diberikan selama 20 hari dimulai setelah masa defisiensi estrogen. Pembuatan preparat histologi kulit mencit dilakukan dengan metode parafin dan pewarnaan HE (Haematoxylin Eosin). Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi pengukuran ketebalan epidermis dan dermis mencit. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji OneWay ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% atau  $\alpha=0,05$  yang dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan.



Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai hitam selama 20 hari pada mencit ovariektomi unilateral dengan dosis 0,31 g/ml/hari mampu meningkatkan ketebalan epidermis dan dermis dengan nilai rata-rata berturut-turut 91,69  $\mu\text{m}$  dan 620,48 $\mu\text{m}$ . Sedangkan pada dosis 0,63 g/ml/hari mampu meningkatkan ketebalan epidermis dan dermis dengan nilai rata-rata berturut-turut 58,93  $\mu\text{m}$  dan 605,86  $\mu\text{m}$ . Kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian ekstrak tepung kedelai hitam selama 20 hari pada mencit pasca ovariektomi menunjukkan bahwa pada dosis 0,31 g/ml/hari dan 0,63 g/ml/hari berpengaruh terhadap peningkatan ketebalan kulit meliputi ketebalan epidermis dan dermis. Pemberian ekstrak kedelai hitam pada dosis 0,31g/ml/hari menunjukkan hasil ketebalan kulit yang tinggi dibandingkan dosis 0,63 g/ml/hari pada mencit pasca ovariektomi.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi, yang berjudul: "Pengaruh Ekstrak Etanol Kedelai Hitam (*Glycine soja* Sieb. Et Zucc.) Terhadap Ketebalan Kulit Mencit (*Mus musculus* L.) Pasca Unilateral Ovariektomi". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada 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. dan Dra. Susantin Fajariyah, M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan bimbingan, pengarahan, dan motivasi hingga terselesaikannya skripsi ini;
2. Eva Tyas Utami, S.Si.,M.Si. dan Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd. selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, kritik dan saran guna terselesaikannya skripsi ini dengan baik;
3. Rendy Setiawan, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang membimbing serta memberikan masukan dan mengarahkan penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Ibu Yanti selaku Teknisi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Soebandi Jember yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing dan membantu saya selama melakukan penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi;
5. Ir. Effe Fadjriah E.D, M.ST., selaku Teknisi Laboratorium Zoologi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
6. seluruh dosen pengajar, staff akademik, dan teknisi Biologi FMIPA Universitas Jember yang telah mendukung dan membantu dalam masa perkuliahan hingga terselesaikannya skripsi ini;

7. rekan-rekan kerja selama penelitian Reno Astin Andriyani, Resa Miftahatu Yuniar, Rilla Nofita Putri dan Hilda Aunillah terima kasih atas kerjasamanya, kalian partner kerja sekaligus saudara baru yang tidak akan pernah tergantikan;
8. kakak angkatan Mbak Yeni, dan Mbak Lidia terima kasih atas bimbingan dan pengarahannya selama penulis melakukan penelitian, serta teman Lab Zoologi Fara Difka Afdilla dan Zilfi Dita F. Terima kasih atas dukungan dan motivasinya;
9. sahabat-sahabatku Frisma Eri Saputri, Risa Charisatin Nisa', Muhammad Choirul Badri, Poni Faj'riatin, Deva Tri Rahayu, Silfi Galuh Navitasari, Retno Anggraini, dan Lita P. terimakasih telah menjadi saudara selama penulis berada di Jember.
10. saudara seperjuangan BIOGENES15 terimakasih atas semangat dan kenangannya hingga sampai pada akhir masa perkuliahan.
11. teman-teman pengurus BEM FMIPA Universitas Jember periode 2017-2018 terimakasih atas semangat, doa dan motivasinya.
12. semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, terimakasih atas bantuan dan dukungannya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Jember, 16 Juni 2019

Penulis

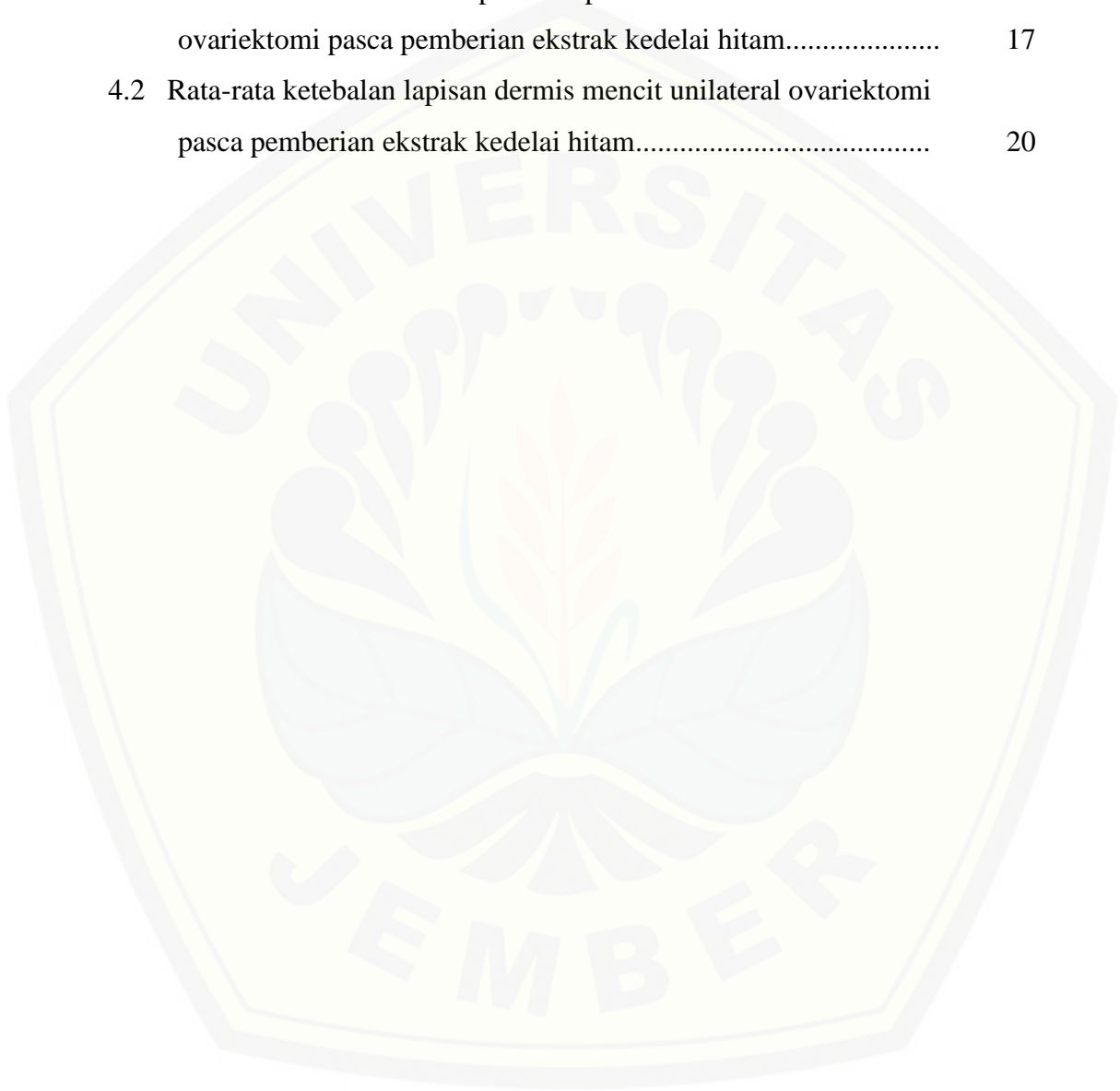
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING .....	vi
HALAMAN PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Struktur Histologi Kulit .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Peran Keratinosit Terhadap Ketebalan Epidermis.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Peran Kolagen Terhadap Ketebalan Dermis .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Peran Estrogen terhadap Proliferasi Keratinosit dan Sintesis Kolagen.....</b>	<b>7</b>
<b>2.5 Kandungan Isoflavon pada Kedelai Hitam (<i>Glycine soja</i>)....</b>	<b>8</b>
<b>2.6 Hipotesis.....</b>	<b>9</b>

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Tahapan Penelitian .....</b>	<b>13</b>
<b>3.5 Parameter Penelitian .....</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Analisis Data.....</b>	<b>15</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam Terhadap Ketebalan         Lapisan Epidermis Mencit Unilateral Ovariectomi.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam Terhadap Ketebalan         Lapisan Dermis Mencit Unilateral Ovariectomi .....</b>	<b>20</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>25</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>33</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Rata-rata ketebalan lapisan epidermis mencit unilateral ovariektomi pasca pemberian ekstrak kedelai hitam.....	17
4.2 Rata-rata ketebalan lapisan dermis mencit unilateral ovariektomi pasca pemberian ekstrak kedelai hitam.....	20

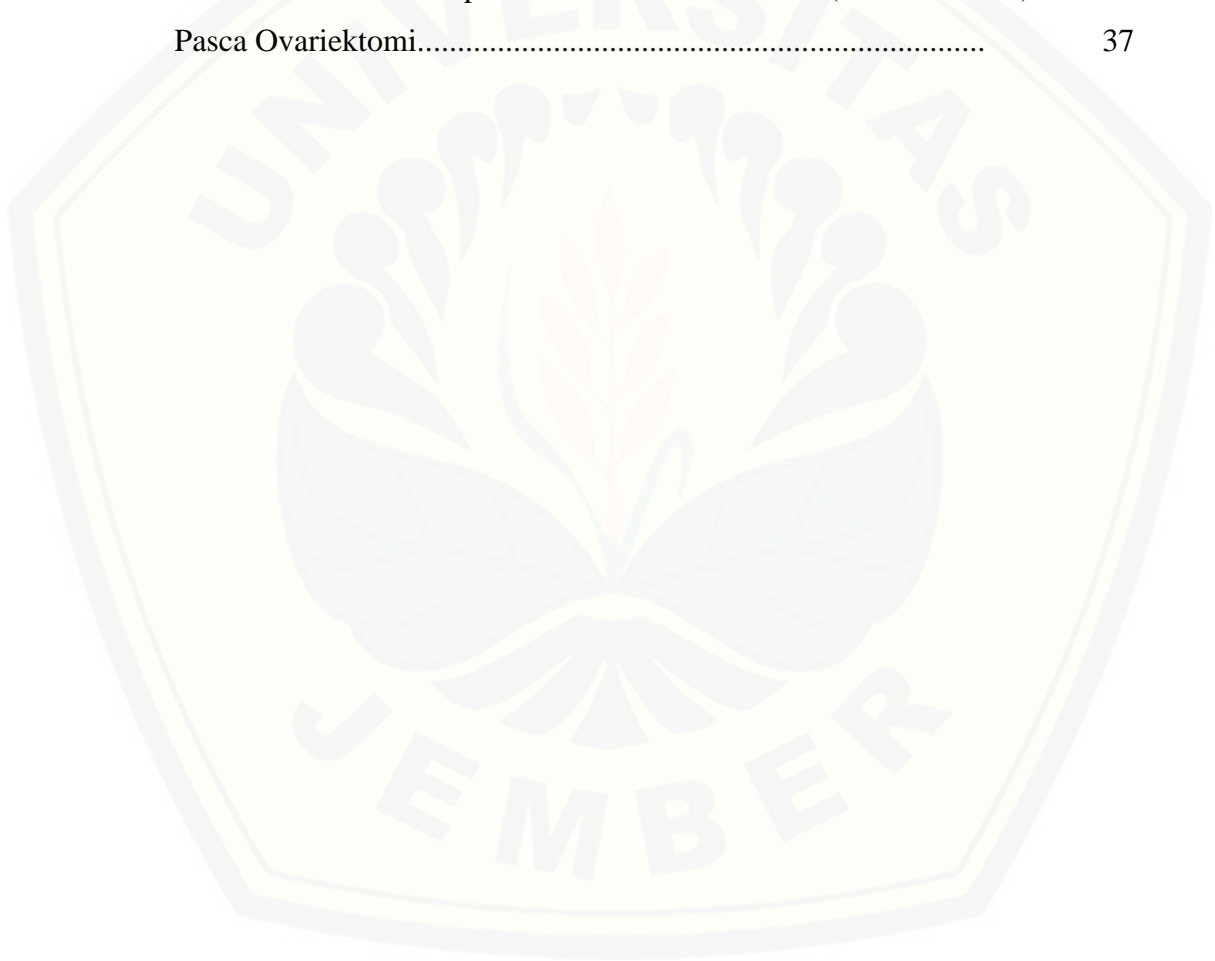


**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Struktur histologi kulit pewarnaan Hematoxylin Eosin .....	4
2.2 Struktur histologi epidermis .....	5
2.3 Tingkat densitas kolagen mempengaruhi ketebalan dermis.....	6
2.4 Struktur kimia isoflavon.....	8
2.5 Mekanisme kerja genestein pada fibroblas .....	9
4.1 Struktur histologi epidermis mencit unilateral ovariektomi pasca pemberian ekstrak kedelai hitam dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin.....	20
4.2 Struktur histologi dermis mencit unilateral ovariektomi pasca pemberian ekstrak kedelai hitam dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin .....	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penentuan Dosis.....	35
B. Hasil Analisis Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Ketebalan Epidermis Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) Pasca Ovariektomi .....	36
C. Hasil Analisis Statistik <i>One way</i> ANOVA Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam terhadap Ketebalan Dermis Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) Pasca Ovariektomi.....	37





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ovariektomi merupakan tindakan pengambilan ovarium pada organ reproduksi betina. Ovariektomi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu Unilateral ovariektomi (pengambilan satu ovarium) dan ovariektomi bilateral (pengambilan 2 ovarium). Ovariektomi dapat menyebabkan penurunan kadar estrogen (Cassidy *et al.*, 2006). Penurunan kadar estrogen menyebabkan terganggunya proliferasi keratinosit pada epidermis dan penurunan sintesis kolagen dalam dermis, sehingga akan mempengaruhi ketebalan kulit (Son *et al.*, 2005).

Kulit merupakan jaringan terluar tubuh dan memiliki fungsi utama sebagai proteksi terhadap gangguan eksternal, termasuk radiasi sinar UV, zat kimia berbahaya, serta mikroba (Bradell dan Kenneth, 2008). Struktur kulit terdiri atas epidermis dan dermis (Brown dan Burns, 2005). Lapisan epidermis tersusun oleh sel non keratinosit dan sel epitel pipih berlapis yang disebut dengan keratinosit. Lapisan di bawah epidermis adalah dermis yang mengandung saraf sensoris, kelenjar keringat, folikel rambut, dan jaringan ikat (Kalangi, 2013). Jaringan ikat pada dermis tersusun atas protein, sel jaringan ikat, serta substansi dasar berupa glikosaminoglikans dan glikoprotein (Fawcett, 1994). Komponen protein jaringan ikat berupa kolagen dan elastin yang terdapat pada dua stratum dermis, yaitu stratum papilar dan stratum retikular (Akbar, 2007). Stratum papilar mengandung sedikit elastin dan kolagen, sedangkan stratum retikular mengandung banyak elastin dan kolagen, selain itu pada stratum retikular juga terdapat komponen sel jaringan ikat yaitu fibroblas (Kalangi, 2013).

Dermis mengandung kolagen sebesar 85-90% (Castelo-Branco *et al.*, 1993). Kandungan kolagen berperan terhadap ketebalan kulit (Markova *et al.*, 2004). Kolagen akan membentuk ikatan antar sel fibroblas dan menyebabkan ketebalan dermis. Kandungan kolagen yang rendah dapat mengakibatkan struktur kulit kendur dan tipis sehingga menyebabkan rentan terhadap luka, selain itu

rendahnya kandungan kolagen juga menyebabkan terhambatnya penyembuhan luka (Junquiera *et al.*, 2007).

Ketebalan kulit dipengaruhi oleh hormon estrogen. Estrogen akan berikatan dengan reseptor  $\beta$ -estrogen pada keratinosit dan menyebabkan proliferasi sel (Son *et al.*, 2005).  $\beta$ -estrogen juga terdapat pada fibroblas dermis (Kavitha dan Thampan, 2008). Ikatan estrogen dengan reseptor estrogen dapat memicu sel fibroblas dermis untuk mensekresikan molekul prokolagen membentuk kolagen (Junqueira *et al.*, 2007; Irrera *et al.*, 2017). Menurut Kavitha dan Thampan (2008) defisiensi estrogen dapat menurunkan densitas kolagen. Hal ini didukung oleh Kafantari *et al.* (2000) yang menyebutkan bahwa tikus ovariectomi dengan masa defisiensi estrogen 6 dan 24 minggu mengakibatkan menurunnya densitas kolagen kulit. Kandungan kolagen yang rendah merupakan indikasi dari menurunnya ketebalan kulit (Raine-Fenning *et al.*, 2003). Estrogen juga dapat mengurangi aktivitas enzim *metalloproteinase* (MMP) yang berfungsi dalam mendegradasi kolagen (Baumann dan Saghari, 2009).

Defisiensi estrogen dapat diatasi dengan pemberian fitoestrogen (Primiani, 2013). Fitoestrogen merupakan kelompok hasil metabolit sekunder dari tumbuhan yang berperan sebagai estrogen eksogen alami (Glover dan Assinder, 2006). Kelompok fitoestrogen antara lain isoflavon, lignin, dan coumestan (Jefferson *et al.*, 2002). Isoflavon merupakan kelompok fitoestrogen yang memiliki kemampuan estrogenik paling kuat (Biben, 2012). Menurut Nanashima, *et al.* (2018) menunjukkan bahwa pemberian 3% ekstrak *blackcurrant* sebagai sumber fitoestrogen dapat meningkatkan kandungan kolagen dermis pada mencit ovariectomi.

Salah satu tumbuhan yang mengandung fitoestrogen adalah kedelai hitam (*Glycin soja*). Kedelai hitam mengandung senyawa isoflavon yang terdiri atas genestein 56,9%, daidzein 40,5%, dan glicetin 2,6% (Fawwaz *et al.*, 2016). Genestein mempunyai afinitas tinggi untuk berikatan dengan reseptor  $\beta$ -estrogen, sehingga akan menginisiasi proliferasi keratinosit, sintesis kolagen, dan mengurangi aktivitas MMP pada kulit (Thornton, 2013; Baumann dan Saghari, 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek

pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap ketebalan kulit pada mencit (*Mus musculus*) pasca ovariektomi.

### **1.2 Rumusan masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) dapat mempengaruhi ketebalan kulit yaitu ketebalan epidermis dan dermis mencit (*Mus musculus* L.) pasca ovariektomi.

### **1.3 Batasan masalah**

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Mencit yang digunakan adalah mencit strain Balb/C
2. Pengamatan dilakukan pada lapisan epidermis dan dermis kulit mencit bagian dorsal

### **1.4 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap ketebalan kulit yaitu ketebalan epidermis dan dermis mencit (*Mus musculus* L.) pasca ovariektomi.

### **1.5 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat berupa informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycine soja*) terhadap ketebalan kulit mencit (*Mus musculus* L.) pasca ovariektomi, serta memberikan informasi mengenai potensi kedelai hitam (*Glycine soja*) sebagai sumber estrogen eksogen alami yang dapat dijadikan sebagai alternatif terapi hormon estrogen pada wanita menopause.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Struktur Histologi Kulit

Kulit merupakan jaringan terluar yang menutupi tubuh dan berperan sebagai proteksi terhadap gangguan eksternal, meliputi gangguan fisik (panas, dingin, radiasi sinar UV), gangguan kimiawi berupa zat kimia berbahaya, gangguan mikroba (bakteri, virus, jamur), serta gangguan mekanik berupa tekanan dan gesekan (Bradell dan Kenneth, 2008). Kulit terdiri atas lapisan epidermis dan dermis (Brown dan Burns, 2005). Struktur histologi kulit dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Struktur histologi kulit dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (Sumber: Naveen *et al.*, 2012)

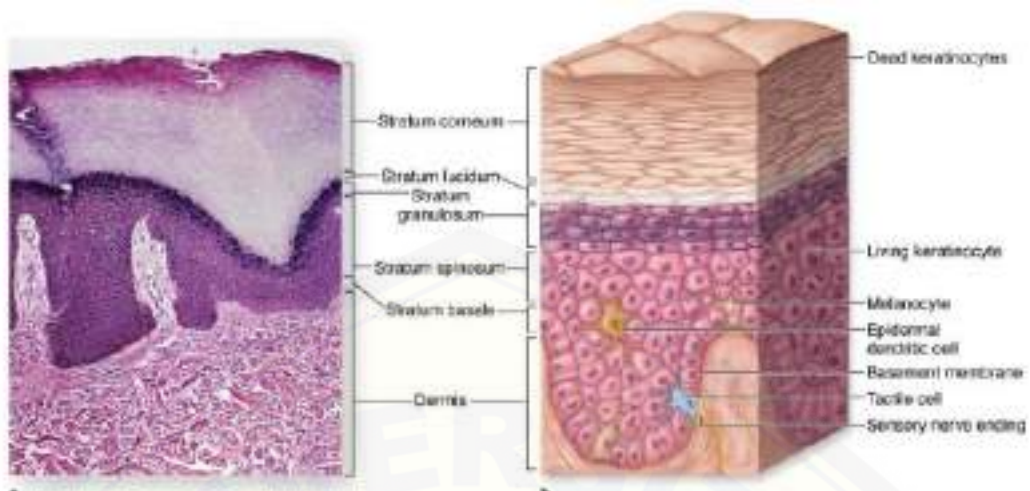
Epidermis merupakan lapisan terluar kulit. Epidermis terdiri atas keratinosit dan non keratinosit (melanosit, sel Langerhans, dan sel Merkel). Keratinosit terdiri atas epitel pipih berlapis yang tersusun pada 5 stratum antara lain stratum basal, spinosum, granulosum, lusidum (stratum yang hanya terdapat pada kulit tebal), serta korneum (Kalangi, 2013). Keratinosit pada stratum basal yang merupakan lapisan paling bawah pada epidermis merupakan keratinosit yang aktif membelah (Maibach dan Honari, 2014).

Lapisan kedua pada kulit yaitu dermis. Dermis berukuran lebih tebal dibandingkan dengan epidermis. Dermis mengandung banyak jaringan ikat. Jaringan ikat pada dermis tersusun atas protein (elastin dan kolagen), sel jaringan ikat (fibroblas), dan substansi dasar (glikosaminoglikans dan glikoprotein). Selain itu dalam lapisan dermis juga terdapat saraf sensoris, kelenjar keringat, dan folikel rambut (Kalangi, 2013).

Dermis terdiri atas 2 lapisan yaitu stratum papilaris dan retikularis (Akbar, 2007). Stratum papilaris berisi jaringan ikat longgar yang mengandung sedikit elastin dan kolagen. Sedangkan stratum retikularis yang berada di bawah stratum papilaris terdiri atas fibroblas dan jaringan ikat padat yang mengandung banyak kolagen, elastis, serta retikulin (Kalangi, 2013).

## **2.2 Peran Keratinosit Terhadap Ketebalan Epidermis**

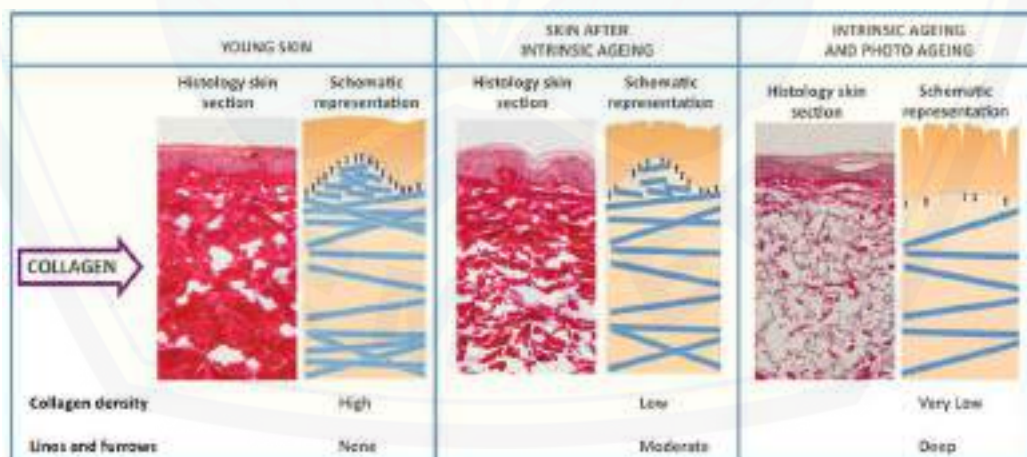
Lapisan epidermis mengandung keratinosit sebesar 85-95% (Kalangi, 2013). Setiap stratum dalam epidermis memiliki bentuk keratinosit yang berbeda-beda, dapat dilihat pada Gambar 2.2. Keratinosit yang terdapat pada stratum basal berbentuk kuboid dan merupakan keratinosit yang aktif membelah. Mitosis keratinosit pada stratum basal akan bermigrasi ke stratum di atasnya yaitu stratum spinosum, granulosum, hingga menjadi sel *corneocytes* di bagian stratum korneum (Brandner *et al.*, 2015). Proses tersebut disebut dengan keratinisasi (Kapusniak, 2006). Apabila kemampuan proliferasi keratinosit pada stratum basal berkurang, maka dapat menyebabkan terhambatnya proses keratinisasi, sehingga sel-sel pada epidermis menjadi lebih tipis dibandingkan lapisan epidermis yang normal (Boulter *et al.*, 2013).



Gambar 2.2, Struktur histologi epidermis (Sumber: Mescher, 2010).

### 2.3 Peran Kolagen Terhadap Ketebalan Dermis

Lapisan dermis mengandung jaringan ikat berupa kolagen sebesar 85-90%. Kolagen disintesis oleh sel fibroblas (Castelo-Branco *et al.*, 1993). Kolagen memiliki struktur yang padat, tersusun tidak teratur dan rapat dalam dermis sehingga berperan dalam elastisitas dan ketebalan dermis (Hernawati, 2008; Markova *et al.*, 2004). Kolagen juga bertanggung jawab terhadap penyembuhan luka (Junquiera *et al.*, 2007).



Gambar 2.3 Tingkat densitas kolagen mempengaruhi ketebalan dermis (Sumber: Sibilla *et al.*, 2015)

Tingkat densitas kolagen berpengaruh terhadap ketebalan dermis, hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.3. Penurunan kandungan kolagen dapat

terjadi pada usia tua, kondisi defisiensi estrogen, serta akibat paparan sinar UV berlebih. Penurunan kandungan kolagen mengakibatkan densitas kolagen menurun dan susunannya menjadi teratur (Sibilla *et al.*, 2015). Di dalam dermis, kolagen akan membentuk ikatan antar satu fibroblas dengan fibroblas lainnya. Jumlah kolagen yang berkurang akan menyebabkan ikatan semakin merenggang sehingga akan memperlihatkan kondisi dermis yang kendur dan tipis. Disebutkan oleh Son, *et al.* (2005) bahwa ketebalan lapisan dermis ditentukan oleh kandungan jaringan ikat khususnya kolagen. Lebih lanjut disebutkan bahwa penurunan kandungan kolagen dapat diukur melalui ketebalan dermis (Raine-Fenning *et al.*, 2003).

#### **2.4 Peran Estrogen terhadap Proliferasi Keratinosit dan Sintesis Kolagen**

Estrogen merupakan hormon steroid yang diproduksi oleh ovarium (Heffner dan Schust, 2005). Reseptor hormon estrogen pada kulit terdapat di keratinosit pada epidermis dan fibroblas dermis (MacLean *et al.*, 1990). Hormon estrogen yang bekerja pada keratinosit dan sel fibroblas kulit menyebabkan meningkatnya elastisitas dan ketebalan kulit (Son *et al.*, 2005). Terdapat reseptor  $\alpha$ -estrogen dan  $\beta$ -estrogen pada keratinosit dan fibroblas (Perzelova *et al.*, 2016; Hacynski *et al.*, 2002). Kadar reseptor  $\beta$ -estrogen lebih tinggi daripada  $\alpha$ -estrogen pada keratinosit dan fibroblas (Thornton *et al.*, 2003; Hacynski *et al.*, 2002).

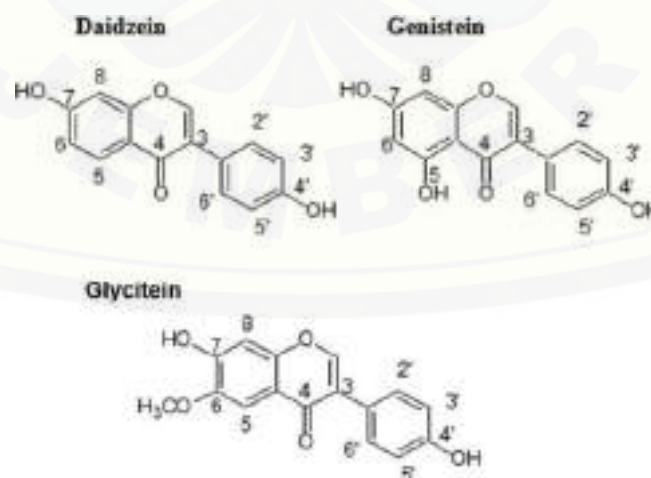
Menurut Son *et al.* (2005) bahwa pemberian topical  $17\beta$ -estradiol terhadap kulit dapat menstimulus proliferasi keratinosit melalui pengikatan reseptor  $\beta$ -estrogen, sehingga dapat meningkatkan ketebalan epidermis. Peran estrogen dalam mempengaruhi ketebalan epidermis dilaporkan oleh Comelekoglu, *et al.* (2012) yang menunjukkan bahwa tikus ovariectomi dengan masa defisiensi estrogen 3 bulan mempunyai lapisan epidermis lebih tipis dibandingkan dengan tikus normal.

Peranan estrogen lainnya pada kulit yaitu berperan terhadap sintesis kolagen (Son *et al.*, 2005). Estrogen bekerja pada fibroblas melalui 2 jalur yaitu melalui regulasi *Growth Factor* yang akan berikatan dengan reseptor tirosin kinase. Jalur kedua yaitu melalui pengikatan estrogen dengan reseptor  $\beta$ -estrogen

pada fibroblas (Son *et al.*, 2005; Thornton, 2013). Hal tersebut akan menstimulus fibroblas untuk mensintesis molekul prokolagen yang kemudian membentuk kolagen (Junquiera *et al.*, 2007). Peran estrogen dalam mempengaruhi sintesis kolagen telah dilaporkan oleh Kafantari *et al.* (2000) yang menyebutkan bahwa tikus ovariektomi dengan masa defisiensi estrogen 6 dan 24 minggu mengakibatkan menurunnya densitas kolagen kulit. Estrogen juga mempengaruhi aktivitas enzim *metalloproteinase* (MMP) yang berfungsi dalam mendegradasi kolagen. Defisiensi estrogen akan mengaktifkan MMP sehingga akan terjadi penurunan densitas kolagen yang berefek pada penurunan ketebalan lapisan dermis (Baumann dan Saghari, 2009).

### 2.5 Kandungan Isoflavon pada Kedelai Hitam (*Glycine soja*)

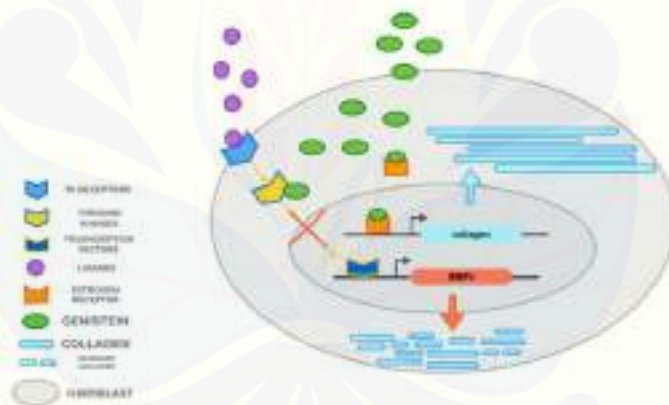
Kedelai hitam merupakan salah satu tumbuhan yg berpotensi sebagai sumber fitoestrogen. Fitoestrogen terdiri atas isoflavon, lignin, dan coumestan yang merupakan hasil metabolit sekunder dari tumbuhan dan dapat berperan sebagai estrogen eksogen (Sitasiwi *et al.*, 2008; Jefferson *et al.*, 2002). Isoflavon adalah sumber estrogen eksogen alami yang paling banyak dimanfaatkan (Biben, 2012). Isoflavon memiliki struktur kimia mirip estrogen yang disebut dengan struktur cincin fenolat, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen tubuh (Winarsi, 2005). Struktur kimia pada isoflavon dapat dilihat pada Gambar 2.5



Gambar 2.5, Struktur kimia isoflavon (Sumber: Nakamura *et al.*, 2001).



Kelompok tumbuhan *Leguminoceae* khususnya kedelai memiliki kandungan isoflavon yang tinggi dibandingkan dengan jenis tumbuhan lainnya (Pradana, 2008). Kedelai hitam merupakan sumber fitoestrogen dari kelompok *Leguminoceae* yang memiliki kandungan isoflavon tertinggi dibandingkan dengan kedelai kuning, koro hitam, dan koro kratok (Sulistiani *et al.*, 2014). Senyawa isoflavon dalam kedelai hitam terdiri atas genestein 56,9%, daidzein 40,5%, dan glicetin 2,6% (Fawwaz *et al.*, 2016). Genestein mempunyai afinitas yang tinggi untuk mengikat  $\beta$ -esterogen, sehingga memiliki efek positif pada kulit untuk meningkatkan proliferasi keratinosit dan produksi prokolagen oleh sel fibroblas (Thornton, 2013). Mekanisme genestein dalam mempengaruhi fibroblas ditunjukkan pada Gambar 2.6. Genestein akan berikatan dengan reseptor  $\beta$ -estrogen fibroblas dan menyebabkan fibroblas mensintesis prokolagen menjadi kolagen



Gambar 2.6 Mekanisme kerja genestein pada fibroblas  
(Sumber: Irrera *et al.*, 2017)

## 2.6 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak kedelai hitam dapat meningkatkan ketebalan epidermis mencit pasca ovariektomi
2. Pemberian ekstrak kedelai hitam dapat meningkatkan ketebalan dermis mencit pasca ovariektomi

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2019, dilakukan di Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, serta di Laboratorium Patologi Anatomi RS. Soebandi Jember,

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang mencit berukuran 34x 25x 12cm dari bak plastik, penutup ram kawat besi, dan botol minum mencit, oven, timbangan duduk skala gram, grinder, saringan tepung 60 mesh, beaker glass (1000 ml, 600 ml, 200 ml), gelas ukur 100 ml, corong plastik kecil, spatula, cawan porselen 75 cc, dan *waterbath*.. papan bedah, *sput injection* (Terumo Syringe 1cc/ml) 0,65 x 32 mm, ekskavator, *hecting set*, silet jarum sutura no.2 (One Med), *rotary microtom*, mikroskop, dan *OptiLab*. Pemberian ekstrak kedelai hitam pada mencit menggunakan jarum *gavage*.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus* L.) betina strain Balb/C yang diperoleh dari *Pusvetma* Surabaya umur 2 bulan, pakan pallet (*BRI*) produksi PT. Chareon Pokphand Indonesia Animal Feedmill Co. Ltd Jakarta, sekam padi, akuades, *ketamine* (Pantex-Holland B. V)10%, *xyla* (Pantex-Holland B. V), benang silk dan *cat gut* no.3, betadine (*Povidone Iodine*) 10%, alkohol 70% (*Mediss*), antibiotik (Levoflaxacin), cairan NaCl 0,9%, parasetamol, kasa steril (*One me*), biji kedelai hitam dari Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian Malang, kertas saring, kain saring, tissue, gloves, kloroform, larutan fiksasi (formalin 10%), alkohol bertingkat 80%, 85%,

90%, 95%, alkohol absolut, *xylol*, parafin, perekat untuk proses *mounting*, dan pewarna Hematoxylin Eosin.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 6 kali pengulangan. Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian ekstrak kedelai hitam, sedangkan variabel terikatnya adalah ketebalan kulit mencit unilateral ovariektomi. Jumlah *Mus musculus* strain Balb/C yang digunakan adalah 24 mencit. Pembagian kelompok uji penelitian ini adalah:

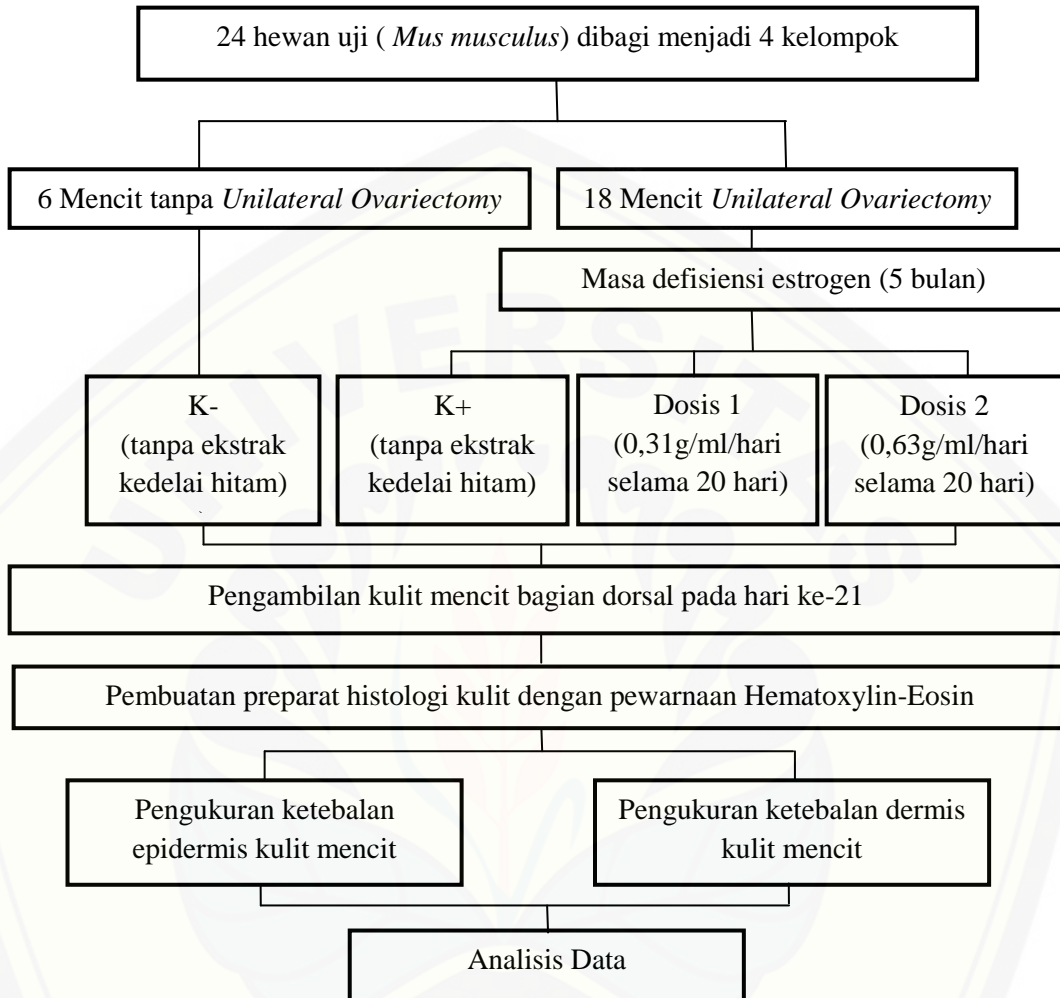
Kelompok 1: kontrol negatif yaitu mencit tanpa ovariektomi serta tanpa pemberian ekstrak kedelai hitam.

Kelompok 2: kontrol positif yaitu mencit ovariektomi, tanpa pemberian ekstrak kedelai hitam.

Kelompok 3: pemberian ekstrak kedelai hitam pada mencit ovariektomi dengan dosis 0,31g/ml/hari selama 20 hari.

Kelompok 4: pemberian ekstrak kedelai hitam pada mencit ovariektomi dengan dosis 0,63g/ml/hari selama 20 hari.

Rancangan penelitian secara garis besar dapat dilihat berdasarkan gambar dibawah :



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### 3.4 Tahapan Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit betina strain Balb/C umur 60 hari. Mencit dipelihara pada kandang berupa bak plastik dengan tutup berupa kawat yang menutupi bagian atas kandang. *Mus musculus* dipelihara dengan pemberian pakan berupa pakan pellet (*BR1*) dan diberikan minum secara *ad libitum*.

### 2.6.1 Perlakuan Mencit *Unilateral Ovariectomy*

Mencit dibius dengan ketamine 10 % dan *xyla* dengan perbandingan 1:1 sebanyak 0,05 ml. Mencit diletakkan secara terlentang pada papan bedah dan dilakukan pembedahan pada daerah abdomen serta diinsisi pada *Muculus oblikus abdominis eksternus* dan *Musculus oblikus abdominis internus*. Salah satu ovarium dipotong. Proses penutupan dengan dijahit pada bagian *M. oblikus abdominis internus* menggunakan benang *cat gut* sedangkan *M. oblikus abdominis eksternus* menggunakan benang *silk*. Perawatan luka dilakukan dengan pemberian antibiotik sebanyak 0,05 ml dan parasetamol selama 1 minggu (Strom *et al.*, 2012).

### 3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kedelai Hitam

Kedelai hitam ditimbang, kemudian dioven dalam suhu 40-45°C selama 2-3 hari. Selanjutnya digrinder dan diayak, kemudian tepung kedelai hitam ditimbang dan dimaserasi dalam alkohol 70 % dengan perbandingan 1:4 (200 gram tepung kedelai hitam: 800 ml alkohol 70 %) dan dihomogenkan, selanjutnya dimaserasi selama 2 x 24 jam. Supernatan disaring untuk mendapatkan filtratnya. Filtrat dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* dengan suhu 90°C hingga diperoleh filtrat tanpa alkohol. Filtrat tanpa alkohol dipanaskan di *waterbath* selama  $\pm$  8 jam untuk mendapatkan *crude extract dalam* bentuk pasta (Panizzi *et al.*, 2002).

### 3.4.4 Perlakuan Hewan Uji

Pemberian ekstrak kedelai hitam dilakukan pada mencit ovariektomi yang dimulai pada bulan ke-5. Pemberian ekstrak kedelai hitam dilakukan selama 20 hari berturut-turut secara oral (*gavage*) pada mencit. Dosis yang digunakan sesuai dengan penelitian (Abdi, 2017) yaitu 0,31g/ml/hari dan 0,63g/ml/hari. Pemberian ekstrak kedelai hitam dengan cara mencampurkan takaran pasta dengan aquades 1ml sesuai dosis yang ditentukan yaitu 0,31g/ml/hari dan 0,63g/ml/hari.

### 3.4.5 Pembuatan Preparat Histologi Kulit

Mencit dianestesi dengan kloroform dan diletakkan di atas papan bedah dengan posisi telentang, kemudian dilakukan pembedahan hewan uji. Tahap pertama pengambilan sampel kulit yaitu penghilangan rambut-rambut kulit bagian dorsal menggunakan silet. Selanjutnya dibuat sayatan pada kulit bagian dorsal punggung dengan ukuran 3x3cm. Berdasarkan Dellman dan Brown (1992) kulit bagian dorsal termasuk kulit tipis yang memiliki ketebalan kulit lebih tinggi dibandingkan dengan kulit ventral. Menurut Suntoro (1983) pembuatan preparat histologi dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu:

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

Proses fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan sampel kulit yang telah diambil ke dalam botol flakon berisi PBS formalin 10% selama 2 hari dan dicuci dengan alkohol 70%. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi yaitu memindahkan sampel kulit pada alkohol bertingkat dimulai dari alkohol 70%, 80%, dan 95% masing-masing selama 1,5 jam. Selanjutnya dimasukkan dalam alkohol absolut dan xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1, dan 1:3 masing-masing selama 30 menit. Tahapan selanjutnya yaitu *clearing* menggunakan xylol selama 24 jam.

#### b. *Infiltrasi dan Embedding*

Infiltrasi dilakukan dengan mengganti senyawa *clearing* pada jaringan menggunakan xylol parafin 1:1 selama 30 menit, kemudian menggunakan parafin I, II, III masing-masing 30 menit. Proses infiltrasi dilakukan didalam oven pada suhu 50-56°C. Tahapan selanjutnya adalah *embedding* yaitu dilakukan penanaman sampel kulit, sehingga akan dihasilkan kulit dalam blok parafin yang ditempelkan pada balok kayu.

#### c. *Sectioning (Penyayatan) dan Affixing (Perekatan)*

Blok parafin disayat menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 µm. Kemudian irisan direkatkan di atas objek glass yang sebelumnya telah diolesi campuran albumin dan gliserin.

d. *Staining* (Pewarnaan) dan *Mounting* (Penutupan)

Sebelum diwarnai, dilakukan deparafinisasi yaitu penghilangan parafin menggunakan xylol selama 15 menit, kemudiandilakukan hidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari alkohol absolut, 95%-30%, dan dilanjutkan pada aquades. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan Haematoxylin selama 3-7 detik, dicuci dengan akuades kemudian preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat 30%-70%, setelah itu dilakukan pewarnaan dengan Eosin selama 3 menit. Preparat dimasukkan kembali dalam alkohol 70%-95% dan alkohol absolut selama 2-3 menit. Selanjutnya dimasukkan kedalam xylol selama 10 menit.

Tahap terakhir adalah proses *mounting* yaitu preparat diolesi menggunakan entelan dan ditutup menggunakan *cover glass*, kemudian diletakkan pada *hotplate* untuk menghilangkan adanya gelembung udara. Preparat histologi kulit yang telah selesai, diamati di bawah mikroskop.

### 3.5 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati adalah pengamatan histologi kulit mencit. Pengamatan histologi kulit dilakukan dengan mengukur ketebalan lapisan epidermis dan dermis menggunakan *Optilab*. Pengukuran dilakukan dalam 1 bidang pandang pada masing-masing sampel. Setiap bidang pandang dilakukan pengukuran pada 6 area (3 area lapisan tipis, 3 area lapisan tebal). Hasil perhitungan dari 6 area tersebut kemudian dirata-rata dan didapatkan nilai rata-rata ketebalan epidermis dan dermis (Oltulu *et al.*, 2018).

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa ketebalan epidermis dan dermis, kemudian dianalisis secara kuantitatif. Data ketebalan kulit secara kuantitatif disajikan dalam bentuk (rata-rata)  $\pm$  standar deviasi. Perhitungan statistik dilakukan menggunakan aplikasi perangkat lunak *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 15.0. Data dianalisis menggunakan uji *OneWay* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% dan nilai signifikansi  $\alpha= 0,05$ . Jika penelitian ini

menunjukkan hasil yang signifikan, maka dilakukan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui adanya beda nyata antar kelompok uji (Steel dan Torrio, 1993).





## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kedelai hitam selama 20 hari dapat meningkatkan ketebalan kulit yaitu ketebalan lapisan epidermis dan dermis mencit pasca unilateral ovariectomi. Pemberian ekstrak kedelai hitam pada dosis 0,31g/ml/hari menunjukkan hasil ketebalan kulit yang tinggi dibandingkan dosis 0,63 g/ml/hari.

### 5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal untuk mengetahui pengaruh ekstrak kedelai hitam terhadap ketebalan kulit mencit (*Mus musculus*) pasca ovariectomi. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan penurunan dosis dan masa pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap mencit pasca ovariectomi.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abdi, Y. F. R. 2017. Efek Pemberian Tepung Kedelai Hitam (*Glycine soja*) Terhadap Leukosit Mencit (*Mus musculus L.*) Implantasi Pasca Ovariektomi. *Skripsi Jurusan Biologi FMIPA*. Jember: Universitas Jember.
- Akbar, A. 2007. *Anatomi dan Fisiologi Kulit Wajah*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Baumann, L., dan L.Saghari. 2009. *Cosmetic Dermatology Principles and Practice 2nd Ed.* The McGraw-Hill Companies, Inc
- Biben, H.A. 2012. Fitoestrogen: Khasiat Terhadap Sistem Reproduksi, Non Reproduksi dan Keamanan Penggunaannya. *Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami*. Universitas Padjajaran.
- Boulter, E.,S. Estrach, A. Errante, C. Pons, L. Cailleteau, F. Tissot, G. Meneguzzi, dan C. C. Feral.2013. CD98hc (*SLC3A2*) regulation of skin homeostasis wanes with age. *The Journal of Experimental Medicine*. 210(1): 173-190.
- Bradell, L. A., dan Kenneth, S. R. 2008. Skin structure and function: the body's primary defense against infection. *Infectious Desease in Clinical Practice*. 16(2): 113-117.
- Brandner, J.M.,M. Kruppa,T. Yoshida, I. Moll, L.A. Beck,dan D.E. Benedetto. 2015. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*. 3(1): 1-9
- Brown, G.; dan T. Burns,. 2005. *Dermatologi Edisi Kedelapan*. Jakarta: Erlangga.
- Cao, C., S. Li,X. Dai, Y. Chen, Z. Feng, Y. Zhao, dan J. Wu. 2009. Genestein inhibits proliferation and functions of hypertropic scar fibroblasts. *Burns*. 35: 85-97.

- Cassidy, A., P. Albertazzi, L.I. Nielsen, W. Hall, G. Williamson, I. Tetens, S. Atkins, H. Cross, Y. Manios, A.Wolk, C. Steiner dan F. Branca. 2006. Critical Review of Health Effects of Soyabean Phyto-oestrogens in Post-menopausal Women. *Proceedings of the Nutrition Society*.65: 76-92.
- Castelo-Branco, C., M. Duran, dan J. Gonzalez-Merlo. 1993. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol Surv*. 48:277-9.
- Circosta, C., R. D. Pasquale, S. Samper, dan F. Occhiuto. 2006. Effects of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 20: 1096-1099.
- Comelekoglu, U.,S. Yalin, E. Balli, dan M. Berkoz. 2012. Ovariectomy decreases biochemichanical quality of skin via oxidative stress in rat. *Turk J Med Sci*. 42(2):201-209.
- Dellmann H.D., dan E. M. Brown. 1992. *Buku Teks Histologi Veteriner*. Terjemahan oleh Hartono R, Penerjemah. Jakarta: UI.
- Fawcett, D.W. 1994. *A Textbook of Histology*. Jakarta: EGC.
- Fawwaz, M., D. S. Muliadi, dan A. Muflihunna. 2006. Kedelai hitam (*Glycine soja*) terhidrolisis sebagai sumber flavonoid total. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4(1): 194-198.
- Flour, M. 2009. *The Pathophysiology of Vulnerable Skin*. World Wide Wounds Article.
- Glover A. Dan S.J. Assinder. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc*. 189: 565-573

- Hacynski, J., R. Tarkowski, K. Jarzabek, M. Slomczynska, S. Wolczynski, D. A. Magoffin, J. A. Jarkowicki, dan A. J. Jakimiuk. 2002. Human cultured skin fibroblast express estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *International Journal of Molecular Medicine*. 10: 149-153
- Heffner, L. J., dan B. Schust. 2005. *Sistem Reproduksi Edisi Kedua*. Jakarta: Erlangga.
- Hernawati. 2008. *Struktur Hewan Jaringan Ikat*. Pendidikan Biologi Universitas Pendidikan Indonesia.
- Hidayat, T., M. Noer, dan S. Rizaliyana. 2013. Peran topikal ekstrak gel *Aloe vera* pada penyembuhan luka bakar derajat dalam pada tikus. *TOC*. 2(2): 26-30.
- Irrera, N., P. Gabriele, R. D'Anna, M. Vacarro, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, dan A. Bitto. 2017. Dietary management of skin health: the role of genistein. *Nutrients*. 9(622): 1-10.
- Jefferson, W.N., E. Padilla-Banks, G. Clark, dan R.R. Newbold. 2002. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chrom. B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sci*. 777(1-2):179-189.
- Junquiera, L. C., J. Carneiro, dan R. O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar dan Atlas*. Jakarta: EGC.
- Kafantari, H., E. Kounadi, M. Fatourus, M. Milonakis, dan M. Tzaphlidou. 2000. Structural alteration in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *ELSEVIER*. 26(4): 349-353
- Kalangi, S. J. 2013. *Histofisiologi Kulit*. Manado: Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi.
- Kapusniak, V. 2006. Keratinization of Epidermal Cell. *Medycyna Weterynaryjna Article*. 62(1): 11-15.

- Kavitha, O. dan R. V. Thampan. 2008. Factors influencing collagen biosynthesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 104: 1150-1160.
- MacLean, A. B., L. A. Nicol, dan M. B.Hodgins. 1990. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the vulva and vagina. *J Reprod Med*.35:1015–16
- Maibach, H. dan G. Honari. 2014. *Applied Dermatoxicology: First Edition*. Academic Press.
- Markova, M. S., J. Zeskand, B. McEntee, J. Rothstein, S. Jimenez, dan L. D. Siracusa. 2004. A role for the androgen receptor in collagen content of the skin. *J Invest Dermatol*. 123(6): 1052-1056.
- Mas'ula, Y. dan A. S. Kusuma. 2018. Artikel Tinjauan: Aktivitas Antikanker Tanaman Rumput Lidah Ular (*Hedyotis difussa* Willd.). *Farmaka*. 15(3): 17-23.
- Mescher, A. L. 2010. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. New York: McGraw Hill Medical.
- Nakamura, Y., A.Kaihara, K.Yoshii, Y.Tsumura, S.Ishimitsu dan Y. Tonogai. 2001. Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan. *Journal of Health Science*. 47(4): 394-406.
- Nanashima, N.,K. Horie, H. Maeda, T. Tomisawa, M. Kitajima, dan T. Nakamura. 2018. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*. 10(495): 1-15.
- Naveen, K., K. Pramod, K. Prasad, dan S. Nayak. 2012. A histological study on the distribution of dermal collagen and elastic fibers in different regions of the bodey. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*. 4(8):171-176.

- Okat, Zehra. 2018. Molecular Dynamics of Estrogen Receptors. *EJMO*. 2(4): 189-197.
- Oltulu, P., B.Ince, N. Kokbudak, S. Findik, dan F. Kilinc. 2008. Measurement of epidermis, dermis, and total skin thickness from six different regions with a new ethical histometric technique. *Turkish Journal of Plastic Surgery*. 26(2): 56-61.
- Panizzi, M. C., S. P. G. Favoni, dan A. Kikuchi. 2002. Extraction time for soybean isoflavone determination. *BRAZILIAN Archives of Biology and Technology*. 45(4): 515-518
- Perzelova, V., F. Sabol, T. Vasilenko, M. Novotny, I. Kovac, M. Slezak, J. Durcak, M. Holly, M. Pilatova, P. Szabo, L. Varinska, Z. Cripokava, T. Kucera, H. Kaltner, S. Andre, H. Gabius, P. Mucaji, K. Smetana dan P. Gal. 2016. Pharmacological activation of estrogen receptor- $\alpha$  and  $-\beta$  differentially modulates keratinocyte differentiation with functional impact on wound healing. *International Journal of Molecular Medicine*. 37: 21-28.
- Polito, F., H. Marini, A. Bitto, N. Irrera, M. Vaccaro, dan E. B. Adamo. 2012. Genistein aglycone, a soy-derived isoflavone, improves skin changes induced by ovariectomy in rats. *J Pharmacol*. 165(4):994-1005
- Pradana, S. 2008. *Prospek dan Manfaat Isoflavon sebagai Fitoestrogen Bagi Kesehatan*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI
- Primiani, C. N. 2013. Potensi tepung tempe sebagai estrogen alami terhadap uterus mencit menopause. *Sains & Matematika*. 1(2):47-51
- Raine-Fenning, N.J., M. P. Brincat, dan Y. Muscat-Baron. 2003. Skin aging and menopause: implications for treatment. *Am J Clin Dermatol*. 4(6): 371-378.

- Safrida. 2008. Perubahan Kadar Hormon Estrogen Pada Tikus Yang Diberi Tepung Kedelai dan Tepung Tempe. *Tesis*. Bogor: Program Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sahay, R. K., A. K. Unnikrishnan, S. K. Bhadada, dan J. K. Agrawal. 2002. Hormone receptor disorders. *Riview Article JIACM*. 3(1): 65-80.
- Sevrain, S., M. Yaar, J. Cantatore, A. Traish, dan A. Gilchrest. 2004. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via receptor mediated mechanisms. *The FASEB Jurnal*. 1-24.
- Shu, Y. Y. and Maibach. 2011. HI: Estrogen and skin: ther-apeutic options. *Am J Clin Dermatol*. 12:297.
- Sibilla, S., M. Goldfrey, S. Brewer, A. B. Raja, dan L. Genovese. 2015. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies. *The Open Nutraceuticals Journal*. Vol 8: 29-41.
- Sitasiwi, A. J. 2009. Efek paparan tepung kedelai dan tepung tempe sebagai sumber fitoestrogen terhadap jumlah kelenjar endometrium uterus mencit (*Mus musculus L.*). *E-Journal UNDIP*. 17(1): 1-10.
- Son, E. D., J. Y. Lee, S. Lee, M. S. Kim, G. B. Lee, S. Chang, dan J. H. Chung. 2005. Topical application of 17 $\beta$ -estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-b signaling in aged human skin in vivo. *The Journal of Investigative Dermatology*. 124(6): 1149-1162.
- Steel, R., dan Torrio J. 1993. *Prinsip dan prosedur Statistik. Terjemahan dari Principles dan Procedure of Statistic* . Jakarta: Gedia Pustaka.
- Ström, O., J., A. Theodorsson, E. Ingberg, I.M. Isaksson dan E. Theodorsson. 2012. Ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement in rats and mice: A visual demonstration. *Journal of Visualized Experiments*. 64: 1-4.

- Sulistiani, H. R., R. Handayani, dan A. Pangastuti. 2014. Karakterisasi senyawa bioaktif dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol tempe berbahan baku kedelai hitam (*Glycine soja*), koro hitam, (*Lablab purpureus*), dan koro kratok (*Phaseolus lunatus*). *Biofarmasi*. 12(2): 62-72
- Suntoro, S.H. 1983. *Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia)*. Jakarta : Bhratara Karya Aksara.
- Sutejo, I. R., H. D. Nurqistan, I. Rasyada, N. N. Yurriasih, A. Yunniar, dan R. Ramadhani. 2016. Kandungan fitoestrogen ekstrak etanolik akar rami (*Boehmeria nivea*) menurunkan kadar kolesterol tikus yang diovariectomi. *NurseLine Journal*. 1(1): 83-89.
- Thornton, M. J. 2013. Estrogens and Aging Skin. *Dermato-Endocrinology*. 5(2): 264-273.
- Thornton, M. J., A. H. Taylor, K. Mulligan, F. Al-azzawi, dan C. C. Lyon. 2003. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Experimental Dermatology*. 12: 181-190.
- Uyar, B., O. N. Sivrikoz, U. Ozdemir, T. Dasbasi, dan H. Sacar. 2014. Histological investigation of the effect of soybean (*Glycine max*) extracts on the collagen layer and estrogen receptors in the skin of female rats. *Clinics*. 69(12): 854-861.
- Winarsi, H. 2005. *Isolavon Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya Pada Penyakit Degeneratif*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.



## LAMPIRAN

### A. Penentuan Dosis Ekstrak Kedelai Hitam

- Penentuan dosis dihitung berdasarkan penelitian Safrida (2008), yaitu 10 gram berat kering (BK) / 100 gram berat badan (BB) tikus.
- Konversi:  
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  
 $0,24/20 = 0,12$  gram pasta/ gram BB mencit
- Rata-rata BB mencit perlakuan = 35 gram  
 $0,12 \times 35 = 0,42$  gram.
- Penentuan dosis diambil dari acuan yaitu 0,42 gram, setengah lebih tinggi = 0,63 gram (Dosis 2) dan setengah lebih rendah dari 0,63 adalah 0,31 gram (Dosis 1).

## B. Hasil Analisis Statistik Uji *OneWay* ANOVA Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam Terhadap Ketebalan Epidermis Mencit (*Mus musculus*) Pasca Ovariektomi

### Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
KetebalanEpidermis	Kontrol Negatif	,243	6	,200 <sup>*</sup>	,912	6	,447
	Kontrol Positif	,198	6	,200 <sup>*</sup>	,917	6	,481
	Dosis 1	,202	6	,200 <sup>*</sup>	,906	6	,408
	Dosis 2	,277	6	,165	,802	6	,061

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

a. Lilliefors Significance Correction

### Descriptives

KetebalanEpidermis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	6	43,1917	2,66150	1,08655	40,3986	45,9847	40,15	47,93
Kontrol Positif	6	32,8667	3,18968	1,30218	29,5193	36,2140	28,85	36,70
Dosis 1	6	91,6967	8,71822	3,55920	82,5475	100,8459	80,72	101,72
Dosis 2	6	58,9367	12,56599	5,13005	45,7495	72,1239	49,12	82,67
Total	24	56,6729	23,89966	4,87850	46,5810	66,7649	28,85	101,72

### Test of Homogeneity of Variances

KetebalanEpidermis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,684	3	20	,029

### ANOVA

KetebalanEpidermis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11881,616	3	3960,539	63,074	,000
Within Groups	1255,845	20	62,792		
Total	13137,461	23			

**KetebalanEpidermis**

Duncan<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol Positif	6	32,8667			
Kontrol Negatif	6		43,1917		
Dosis 2	6			58,9367	
Dosis 1	6				91,6967
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**C. Hasil Analisis Statistik Uji *OneWay* ANOVA Pengaruh Ekstrak Kedelai Hitam Terhadap Ketebalan Dermis Mencit (*Mus musculus*) Pasca Ovariektomi**

**Tests of Normality**

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KetebalanDermis Kontrol Negatif	,247	6	,200*	,934	6	,611
Kontrol Positif	,210	6	,200*	,950	6	,741
Dosis 1	,164	6	,200*	,940	6	,661
Dosis 2	,267	6	,200*	,853	6	,167

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

a. Lilliefors Significance Correction

**Descriptives**

KetebalanDermis

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol negatif	6	564,5383	10,78026	4,40102	553,2251	575,8515	549,73	582,85
Kontrol positif	6	514,1817	14,93703	6,09802	498,5062	529,8571	494,75	533,43
Dosis 1	6	620,4717	28,27903	11,54486	590,7946	650,1487	580,50	651,88
Dosis 2	6	605,8583	20,88920	8,52798	583,9365	627,7802	584,02	631,60
Total	24	576,2625	46,06614	9,40321	556,8105	595,7145	494,75	651,88

**Test of Homogeneity of Variances**

KetebalanDermis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,321	3	20	,041

**ANOVA**

KetebalanDermis

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40931,098	3	13643,699	34,642	,000
Within Groups	7876,954	20	393,848		
Total	48808,052	23			

**KetebalanDermis**Duncan<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Positif	6	514,1817		
Kontrol Negatif	6		564,5383	
Dosis 2	6			605,8583
Dosis 1	6			620,4717
Sig.		1,000	1,000	,217

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.