

Penelitian

Efek Ekstrak Fraksi Etil Asetat Daun Pelawan pada Kinerja Ovarium Tikus Pascamelahirkan

(The Effect of Ethyl Acetate Fraction of Pelawan Leaves on Postpartum Rat Ovary Performance)

Yusfiati^{1*}, Wasmen Manalu², Hera Maheshwari², Andriyanto²

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematik dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Bina Widya Campus, Jl. Subrantas Kilometer 12.5, Pekanbaru, Provinsi Riau, Indonesia

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Penulis untuk korespondensi: fiayahya@yahoo.com.au

Diterima 26 Mei 2021, Disetujui 14 September 2021

ABSTRAK

Daun Pelawan memiliki kandungan flavonoid dan steroid yang dapat mempengaruhi sistem reproduksi betina. Penelitian ini bertujuan mengkaji efektivitas ekstrak fraksi etil asetat Pelawan pada fisiologis ovarium tikus pascamelahirkan berdasarkan pada prediksi jumlah anak, bobot anak, kadar estrogen, dan bobot ovarium. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pola faktorial. Perlakuan dibagi menjadi perlakuan tikus yang melahirkan sekali dan melahirkan dua kali. Tiap perlakuan terdiri atas kontrol tanpa ekstrak pelawan, tikus diberikan ekstrak pelawan dengan dosis 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, dan 150 mg/kg BB secara peroral. Hasil penelitian menunjukkan jumlah anak dan bobot anak pada induk melahirkan dua kali mengalami peningkatan pada dosis 50 mg. Jumlah anak dan bobot anak pada induk melahirkan sekali mengalami penurunan pada dosis 100 mg. Konsentrasi estrogen pada semua perlakuan mengalami penurunan di hari ke-3 dan meningkat di hari ke-5. Konsentrasi estrogen pada dosis 100 mg memiliki kadar tertinggi dibandingkan dosis 50 mg dan 150 mg. Bobot ovarium mengalami penurunan di hari ke-3 dan meningkat di hari ke-5. Induk melahirkan dua kali dengan dosis 100 mg mengalami peningkatan bobot ovarium dibandingkan dengan dosis lain. Senyawa bioaktif ekstrak Pelawan mempengaruhi jumlah anak, bobot anak, kadar estrogen, dan bobot ovarium. Diduga, senyawa antioksidan pada ekstrak mempengaruhi kinerja hormon pertumbuhan dan faktor pertumbuhan untuk menghasilkan LH dan FSH di kelenjar pituitari.

Kata Kunci : estrogen, ovarium, jumlah anak, pelawan

ABSTRACT

Pelawan leaves contain steroids that can affect the female reproductive system. The aim of this study was to examine the effectivity of Pelawan ethyl acetate fraction-extract on ovarian physiology of postpartum rat, based on the prediction of the litter size, birth weight, estrogen levels, and ovarian weight. The treatment was divided into the group of rats gave birth once and gave birth twice. Each treatment consisted of control without Pelawan extract, rats administered orally with Pelawan extract at doses of 50 mg/kg BW, 100 mg/kg BW, and 150 mg/kg BW. The results showed that litter size and birth weight of baby rats born to maternal rats giving birth twice increased in rats treated with ethyl acetate fraction at a dose of 50 mg. Litter size and birth weights of baby rats born to rats giving birth once decreased in rats treated with ethyl acetate fraction at a dose of 100 mg. The estrogen concentration levels in all treatments decreased on day 3 and increased on day 5. The estrogen concentrations in rats treated with ethyl acetate fraction at a dose of 100 mg were higher than in those treated at doses of 50 mg and 150 mg. The ovarian weights decreased on day 3 and increased on day 5. The ovarian weights of maternal rats giving birth twice treated at a dose of 100 mg increased compared to the other doses. Pelawan extract has bioactive compounds that affect the litter size, birth weight, estrogen levels, and ovarian weight. Allegedly, the antioxidant compounds in the extract affect the performance of growth hormone and growth factors to produce LH and FSH in the pituitary.

Key words: estrogen, ovary, mice number, pelawan

PENDAHULUAN

Ovarium adalah organ reproduksi betina yang menghasilkan ovum dan hormon reproduksi (estrogen dan progesteron). Perkembangan dan pembentukan sel telur di ovarium dipengaruhi oleh interaksi antara hormon steroid intrafolikuler dengan faktor-faktor pertumbuhan, sistem hipotalamus dan hipofisis. Produksi estrogen dan progesteron dipengaruhi oleh sekresi hormon gonadotropin (GnRH) di hipotalamus dan *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) di kelenjar pituitari. Estrogen diproduksi oleh folikel ovarium dan korpus luteum sekitar 95%. Produksi estrogen mulai dihasilkan pada saat fase awal perkembangan folikuler dan sekresinya meningkat selama 7-8 hari sebesar 250–350 pg/mL. Kemudian, sekresi estrogen menurun dan meningkat lagi setelah 5-8 hari. Estrogen menjadi pengatur umpan balik sekresi FSH selama fase luteal (Clarke & Khosla, 2010; Hamni et al., 2010).

Pengobatan yang berasal dari tumbuhan sebesar 50%-60%, dan hampir 80% masyarakat negara berkembang menggunakan obat herbal untuk pengobatan penyakit (Ernest et al., 2018). Beberapa ekstrak tanaman digunakan untuk pengobatan sistem reproduksi. Ovarium adalah organ reproduksi betina yang menghasilkan ovum dan hormon reproduksi (estrogen dan progesteron). Perkembangan dan pembentukan sel telur di ovarium dipengaruhi oleh interaksi antara hormon steroid intrafolikuler dengan faktor-faktor pertumbuhan, sistem hipotalamus dan hipofisis. Produksi estrogen dan progesteron dipengaruhi oleh sekresi hormon gonadotropin (GnRH) di hipotalamus dan *luteinizing hormone* (LH) dan *follicle stimulating hormone* (FSH) di kelenjar pituitari. Estrogen diproduksi oleh folikel ovarium dan korpus luteum sekitar 95%. Produksi estrogen mulai dihasilkan pada saat fase awal perkembangan folikuler dan sekresinya meningkat selama 7-8 hari sebesar 250–350 pg/mL. Kemudian, sekresi estrogen menurun dan meningkat lagi setelah 5-8 hari. Estrogen menjadi pengatur umpan balik sekresi FSH selama fase luteal (Clarke & Khosla, 2010; Hamni et al., 2010).

Pengobatan yang berasal dari tumbuhan sebesar 50%-60%, dan hampir 80% masyarakat negara berkembang menggunakan obat herbal untuk pengobatan penyakit (Ernest et al., 2018). Beberapa ekstrak tanaman digunakan untuk pengobatan sistem reproduksi betina. Ekstrak tanaman tersebut memiliki kandungan fitoestrogen, seperti flavonoid dan isoflavonoid. Fitoestrogen mempunyai struktur molekul yang mirip dengan struktur estrogen endogen di

ovarium. Salah satu fitoestrogen dari isoflavon adalah genistein yang ditemukan dalam kedelai dan dapat meningkatkan perkembangan sistem reproduksi betina (Zin et al. 2013). Penelitian Ernest et al. (2018) melaporkan bahwa pengaruh ekstrak daun *Cnestis ferruginea* pada reproduksi tikus betina selama 30 hari dapat meningkatkan fertilitasi.

Suku Talang Mamak di Kabupaten Siak, Riau, Indonesia menggunakan ekstrak daun Pelawan jenis *Tristanopsis obovate* Benn. untuk pengobatan wanita pascamelahirkan. Uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun Pelawan memiliki kandungan flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid (Sartika et al., 2013). Suatu ekstrak tanaman dilarutkan dalam alkohol 70% dan 96% dengan pengujian GC-MS memperoleh senyawa yang mirip senyawa steroid (Efendi et al., 2016). Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun *T. obovata* Benn. dengan metode DPPH menghasilkan fraksi etil asetat sebesar 28.932 µg/mL, fraksi air 30.188 µg/mL, dan fraksi n-heksana 420.161 µg/mL (Yusfiati et al., 2020). Ekstrak fraksi etil asetat *T. obovata* Benn. memiliki nilai aktivitas antioksidan paling tinggi dibandingkan ekstrak fraksi lain. Aktivitas antioksidan yang tinggi pada beberapa ekstrak tanaman dapat berkhasiat sebagai pengobatan suatu penyakit (Skrovankova et al., 2012). Walaupun demikian, Kasote et al. (2015) menyatakan bahwa khasiat ekstrak tanaman pengobatannya tidak sesuai dengan yang diharapkan karena ekstrak tanaman sampai ke sel tujuan harus melewati beberapa tahapan proses fisiologis. Tahapan tersebut adalah proses penyerapan, distribusi, metabolisme, penyimpanan, dan ekskresi dalam tubuh manusia. Kajian mengenai pengaruh ekstrak daun Pelawan *T. obovata* Benn. yang berkhasiat antioksidan tinggi pada kinerja ovarium belum pernah dilakukan sampai sekarang. Penelitian bertujuan mengkaji efektivitas ekstrak fraksi etil asetat Pelawan pada fungsi fisiologis ovarium tikus pascamelahirkan berdasarkan prediksi jumlah anak, bobot anak, kadar estrogen, dan bobot ovarium.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Pengambilan sampel daun *T. obovata* Benn. dilakukan di Hutan Taman Wisata Sultan Syarif Hasyim, Kabupaten Siak, Riau. Laboratorium Bioteknologi LIPI, Cibinong, Bogor digunakan untuk pembuatan ekstrak fraksi etil asetat. Pengamatan sampel organ ovarium dan anak tikus dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi; IPB. Pengamatan kadar estrogen dilakukan di

Laboratorium Mikrobiologi dan imunologi, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) IPB, Bogor. Penelitian dimulai dari bulan Agustus 2017 sampai Maret 2018.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Fraksi Etil Asetat

Daun Pelawan diambil sebanyak 7 kilogram. Daun diambil dari tangkai daun nomer 2, 3, dan 4. Daun Pelawan yang bersih dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C dan dihancurkan menjadi serbuk kering daun Pelawan. Serbuk Pelawan sebanyak 600 g dilarutkan dengan 6 L etanol 70%. Kemudian, ekstrak dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C dan diperoleh ekstrak kental etanol awal atau *Crude extract*. Komponen-komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak daun Pelawan dipisahkan dengan cara partisi cair-cair untuk mendapatkan ekstrak fraksi etil asetat Pelawan. Pemisahan dilakukan menggunakan pelarut etil asetat. Lapisan yang dihasilkan dikeringkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan diperoleh fraksi etil asetat.

Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik (*Ethical Approval*) dengan nomor 113-2018IPB dari LPPM Institut Pertanian Bogor, Bogor. Pemeliharaan hewan dilakukan di Unit Percobaan Hewan Laboratorium (UPHL), Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor, Indonesia. Sebanyak 86 ekor tikus *Rattus norvegicus* galur Sparague Dawley yang digunakan terdiri atas 72 ekor tikus dara umur 50-60 hari dan 14 ekor tikus jantan umur 50-60 hari. Tikus diaklimatisasi selama 10 hari dalam kandang berukuran 36 x 28 x 12 cm yang di bagian bawahnya dialasi sekam padi. Pakan tikus adalah pelet PUR 512, Bravo. Tikus diberikan obat antibiotik dan obat cacing (Kalibazen 0,2 ml/ekor) secara peroral.

Kelompok penelitian terbagi dua, yaitu kelompok induk yang melahirkan 1 kali (P1) dan kelompok induk melahirkan 2 kali (P2). Kelompok P1 dan P2 terbagi menjadi kelompok control sehat dan kelompok terapi yang diberikan ekstrak fraksi etil asetat daun Pelawan. Kontrol negatif (P1.0 dan P2.0) terdiri atas 9 ekor tikus dara yang hanya diberikan air selama 7 hari sebelum dikawinkan. Kelompok terapi terdiri atas 27 ekor tikus dara yang diberikan ekstrak etil asetat Pelawan (P1 dan P2) dengan dosis berturut-turut 50 mg/kg BB (P1.50 mg; P2.50 mg) (9 ekor), dosis 100 mg/kg BB (P1.100 mg; P2.100 mg) (9 ekor), dan dosis

150 mg/kg BB (P1.150 mg; P2.150 mg) (9 ekor) selama 7 hari sebelum dikawinkan. Ekstrak diberikan pada tikus dara secara peroral menggunakan sonde lambung untuk tikus (P1 50 mg, P1.100 mg, P1.150 mg; P2.50 mg, P2.100 mg, P2.150 mg). Semua tikus dara di kedua kelompok dikawinkan dengan tikus jantan. Tikus dara sebanyak 3 ekor dikawinkan dengan 1 ekor tikus jantan. Kebuntingan tikus betina diketahui dengan cara melihat area lubang vagina berwarna putih atau adanya plag putih. Kemudian, induk bunting dipisahkan dari tikus lainnya. Kebuntingan tikus betina berlangsung selama 20-22 hari.

Tikus betina setelah melahirkan pada perlakuan kontrol tidak diberikan ekstrak selama 5 hari, dan tikus betina perlakuan setelah melahirkan diberikan ekstrak fraksi etil asetat Pelawan selama 5 hari dengan dosis masing-masing 50 mg/kg BB, 100 mg/Kg BB, dan 150 mg/kg BB. Induk melahirkan 2 kali tidak dibedah pada saat melahirkan 1 kali, tetapi diberikan ekstrak selama 5 hari. Setelah anak disapih, induk diberikan ekstrak 7 hari sebelum dikawinkan. Tikus betina yang bunting, dan melahirkan diberikan lagi ekstrak fraksi etil asetat selama 5 hari. Anak tikus yang dilahirkan dari induk melahirkan 1 kali dan 2 kali dicatat bobot badan dan jenis kelaminnya. Induk melahirkan 1 kali dan 2 kali pada perlakuan kontrol (Po.1 dan Po.2) dan perlakuan ekstrak (P1 dan P2) dibius dengan ketamine: xylazine (4:1). Tikus dibedah dengan cara disayat di bagian abdomen hingga toraks. Darah tikus diambil dengan jarum suntik ukuran 1 mL melalui jantung tikus pada masing-masing dosis di hari ke-0, ke-3, dan ke-5 pascamelahirkan. Darah diambil untuk mengukur kadar hormon estrogen. Organ ovarium diambil dan diukur bobotnya pada masing-masing dosis di hari ke-0, ke-3, dan ke-5 pascamelahirkan.

Pengukuran Hormon Estrogen

Sebanyak 3 tabung berisi serum darah induk melahirkan pada masing masing perlakuan dan kontrol diukur dengan metode *Enzyme link immune sorbent assay* atau ELISA (17-beta Estradiol ELISA Kit (abcam, ab108667)). Pengambilan sampel serum untuk analisis hormon dilakukan di setiap hari pembedahan, yaitu hari ke-0, ke-3, dan ke-5 setelah melahirkan pada masing-masing perlakuan dosis ekstrak fraksi etil asetat Pelawan. Pada masing-masing well (suatu wadah berbentuk bulatan kecil-kecil berjumlah 96) dimasukkan 25 µL larutan standar, sampel, dan kontrol yang dicampur masing-masing dengan 200 µL reagen konjugat yang disesuaikan dengan parameter yang diamati (estrogen). Larutan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Campuran di-

kocok dengan cepat dan isi *well* dikeluarkan, dibilas sebanyak 3 kali dengan menambahkan larutan pencuci sebanyak 400 μ L pada setiap *well*. Kemudian, setiap *well* dimasukkan larutan substrat 200 μ L, dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Reaksi enzimatis dihentikan dengan menambahkan 100 μ L *stop solution* ke masing-masing *well*. Nilai absorbansi dibaca pada *ELISA reader* setelah 10 menit dengan absorbansi 450 ± 10 nm (Rosdianto, 2016).

Analisis Data

Hasil penelitian diamati secara kualitatif dan kuantitatif. Data pengamatan kuantitatif jumlah anak, bobot anak, kadar hormon estrogen, dan bobot ovarium di analisis dengan Anova satu arah dan uji T ($P < 0,05$) program SPSS 23 pada kedua kelompok induk melahirkan 1 kali dan 2 kali pada waktu yang berbeda setelah tikus melahirkan yaitu di hari ke-0, 3 dan 5 pascamelahirkan.

HASIL

Jumlah anak dari induk melahirkan 2 kali pada kelompok kontrol dan yang diberi ekstrak menunjukkan jumlah yang lebih banyak daripada jumlah anak pada induk melahirkan 1 kali (Tabel 1, Gambar. 1). Jumlah anak jantan dan betina menunjukkan tidak ada perberbedaan nyata signifikan ($P > 0,05$). Jumlah anak jantan dan betina dari induk melahirkan 1 kali paling rendah di dosis 100 mg dan meningkat jumlahnya pada dosis 150 mg. Jumlah anak jantan dan betina dari induk melahirkan 2 kali pada dosis 50 mg paling tinggi dan menurun dengan pemberian dosis yang meningkat. Frekuensi induk melahirkan, pemberian dosis ekstrak, jenis kelamin anak tikus, interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan pemberian dosis ekstrak, interaksi frekuensi induk melahirkan dengan jenis kelamin anak tikus, interaksi pemberian dosis ekstrak dengan jenis kelamin anak tikus, interaksi frekuensi induk melahirkan dengan pemberian dosis ekstrak, dan jenis kelamin anak tikus tidak berpengaruh pada jumlah anak tikus yang dilahirkan ($P > 0,05$).

Bobot anak tikus induk melahirkan 2 kali pada kelompok kontrol ($P_{2.0}$) memiliki ukuran bobot yang lebih rendah daripada perlakuan yang lain. Bobot anak induk melahirkan 2 kali pada dosis 50 mg ($P_{2.50}$ mg) memiliki ukuran bobot yang lebih tinggi daripada perlakuan yang lain. Secara statistik, bobot anak dari induk melahirkan 1 kali tidak berbeda nyata

dari bobot anak dari induk melahirkan 2 kali (Tabel 2, Gb. 2). Bobot anak tikus dari induk melahirkan 1 kali mengalami penurunan bobot pada dosis 50 mg ($P_{1.50}$ mg). Selanjutnya, bobot anak tikus di dosis 100 mg ($P_{1.100}$ mg) meningkat dan menurun lagi di dosis 150 mg ($P_{1.150}$ mg). Bobot anak tikus dari induk melahirkan 2 kali mengalami peningkatan di dosis 50 mg, dan menurun dratis di dosis 100 mg. Bobot anak meningkat kembali pada dosis 150 mg. Tinggi dan rendahnya ukuran bobot anak tikus berhubungan dengan jumlah anak tikus yang dilahirkan. Bobot anak tikus dari induk melahirkan 1 kali di dosis 100 mg lebih tinggi ukuran bobotnya daripada bobot anak tikus dosis 50 mg dan 150 mg. Bobot anak tikus pada dosis 100 mg yang tinggi disebabkan jumlah anak tikus yang dilahirkan sedikit. Frekuensi induk melahirkan, pemberian dosis ekstrak, interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan pemberian dosis ekstrak tidak berpengaruh pada bobot anak yang dilahirkan ($P > 0,05$).

Konsentrasi hormon estrogen pada induk melahirkan 1 kali lebih tinggi dari induk melahirkan 2 kali dan secara statistik berbeda nyata ($P < 0,05$) (Tabel 3, Gambar. 3A dan 3B). Induk melahirkan 1 kali dari perlakuan kontrol memiliki konsentrasi estrogen yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Pemberian ekstrak dosis 50 mg pada induk melahirkan 1 kali dan 2 kali menghasilkan kadar estrogen paling rendah dari perlakuan lain.

Semua perlakuan mengalami penurunan konsentrasi estrogen di hari ke-3, dan meningkat di hari ke-5. Perlakuan kontrol memiliki kadar estrogen paling tinggi dari ketiga perlakuan dosis. Dosis 100 mg ($P_{1.100}$ mg, $P_{2.100}$ mg) dari induk melahirkan 1 kali dan 2 kali memiliki kadar estrogen yang lebih tinggi tinggi dibandingkan dengan dosis 50 mg ($P_{1.50}$ mg, $P_{2.50}$ mg) dan 150 mg ($P_{1.150}$ mg, $P_{2.150}$ mg). Tinggi dan rendahnya konsentrasi kadar hormon estrogen disebabkan oleh pengaruh kandungan ekstrak fraksi etil asetat Pelawan dan faktor usia tikus. Dosis 100 mg lebih efektif meningkatkan kadar hormon estrogen di darah induk. Frekuensi induk melahirkan, dosis ekstrak, waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan (hari ke-0, ke-3, dan ke-5 tikus setelah melahirkan), sangat nyata mempengaruhi peningkatan dan penurunan konsentrasi estrogen ($P < 0,01$).

Bobot ovarium dari kelompok kontrol dan ekstrak induk melahirkan 1 kali dan 2 kali di hari ke-3 mengalami penurunan, dan peningkatan di hari ke-5. Secara statistik tidak menunjukkan beda nyata ($P > 0,05$) (Tabel 3, Gambar 4A, 4B, 5A, dan 5B). Bobot ovarium di bagian kiri dan kanan dari induk melahirkan 1 kali dan 2 kali yang diberi dosis 100 mg

memiliki bobot ovarium di bagian kiri dan kanan dari induk melahirkan 1 kali dan 2 kali yang diberi dosis 100 mg memiliki bobot yang lebih berat daripada yang diberi dosis 50 mg. Ovarium di bagian kiri dari induk melahirkan 2 kali dengan dosis 150 mg dan 100 mg memiliki bobot yang lebih berat daripada yang diberi dosis 50 mg. Ovarium di bagian kiri induk melahirkan 2 kali dengan dosis 150 mg memiliki bobot yang lebih berat daripada perlakuan yang lain. Peningkatan dan penurunan bobot ovarium disebabkan oleh pengaruh kandungan ekstrak fraksi etil asetat Pelawan dan konsentrasi hormon estrogen di darah induk.

Frekuensi induk melahirkan, perlakuan dosis ekstrak, waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan, interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan dosis ekstrak, interaksi antara perlakuan dosis ekstrak dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan, interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan dosis ekstrak, dan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan tidak berpengaruh pada peningkatan bobot ovarium kanan induk pascamelahirkan. Sementara itu, interaksi frekuensi induk melahirkan dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan berpengaruh pada peningkatan bobot ovarium kanan induk pascamelahirkan ($P < 0,05$).

Tabel 1 Rataan jumlah anak tikus dari induk melahirkan 1 dan 2 kali akibat pemberian ekstrak fraksi etil asetat pelawan

| Dosis | Jumlah anak tikus dari induk melahirkan 1 kali | | Jumlah anak tikus dari induk melahirkan 2 kali | | Level Signifikan | | | | | | | |
|---------|--|--------------------|--|--------------------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|----|
| | | | | | | | | | Interaksi | | | |
| | Jantan | Betina | Jantan | Betina | G ¹ | T ² | Gd ³ | GT ⁴ | GGd ⁵ | TGd ⁶ | GTGd ⁷ | |
| Kontrol | 18,00± | 27,00± | 14,33± | 29,33± | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| | 11,14 ^A | 19,98 ^A | 11,93 ^A | 20,50 ^A | | | | | | | | |
| 50 mg | 16,67± | 25,67± | 20,67± | 28,00± | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| | 10,97 ^A | 16,86 ^A | 15,00 ^A | 19,08 ^A | | | | | | | | |
| 100 mg | 24,33± | 15,67± | 27,33± | 21,00± | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| | 16,29 ^A | 12,66 ^A | 18,77 ^A | 13,45 ^A | | | | | | | | |
| 150 mg | 29,00± | 14,33± | 26,00± | 20,67± | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| | 20,81 ^A | 11,02 ^A | 18,52 ^A | 9,07 ^A | | | | | | | | |

^{A,B,C} $P < 0,05$

G¹. Frekuensi induk melahirkan

T². Perlakuan ekstrak Pelawan

Gd³. Jenis kelamin anak tikus

GT⁴. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan ekstrak

GGd⁵. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan jenis kelamin anak tikus

TGd⁶. Interaksi antara perlakuan ekstrak Pelawan dengan jenis kelamin anak

GTGd⁷. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan ekstrak Pelawan dan jenis kelamin anak tikus

Tabel 2 Rataan bobot anak tikus dari induk melahirkan 1 dan 2 kali akibat pemberian ekstrak fraksi etil asetat Pelawan

| Dosis | Bobot anak tikus dari induk melahirkan 1 kali | | Bobot anak tikus dari induk melahirkan 2 kali | | Level signifikan | | | | |
|---------|---|--|---|--|------------------|----|----------------|----------------|-----------------|
| | | | | | | | Interaksi | | |
| | | | | | | | G ¹ | T ² | GT ⁴ |
| Kontrol | 15,24 ± 6,73 ^A | | 17,98 ± 1,75 ^A | | NS | NS | NS | | |
| 50 mg | 18,39 ± 1,47 ^A | | 19,71 ± 1,91 ^A | | NS | NS | NS | | |
| 100 mg | 18,95 ± 0,95 ^A | | 18,15 ± 0,87 ^A | | NS | NS | NS | | |
| 150 mg | 18,57 ± 2,32 ^A | | 13,12 ± 1,69 ^A | | NS | NS | NS | | |

Tabel 3 Parameter rata-rata kadar hormon estrogen dan bobot ovarium induk tikus melahirkan 1 kali dan 2 kali

| | Hari | Induk betina melahirkan 1 kali | | | | Induk betina melahirkan 2 kali | | | | Level signifikan | | | | | | |
|-------------------------|------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | | Perlakuan dosis | | | | Perlakuan dosis | | | | Interaksi | | | | | | |
| | | 0 mg | 50 mg | 100 mg | 150 mg | 0 mg | 50 mg | 100 mg | 150 mg | G ¹ | T ² | D ³ | GT ⁴ | GD ⁵ | TD ⁶ | GTD ⁷ |
| Kadar Estrogen (nmol/L) | 0 | 110,44±38,68 ^{Db} | 11,40±0,07 ^{Ab} | 64,01±0,00 ^{Cb} | 46,01±0,00 ^{Bb} | 19,83±2,22 ^{Db} | 10,52±2,34 ^{Ab} | 38,62±23,98 ^{Cb} | 16,89±8,98 ^{Bb} | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| | 3 | 25,22±4,57 ^{Da} | 20,67±1,73 ^{Aa} | 7,21±4,15 ^{Ca} | 12,60±5,27 ^{Ba} | 16,70±1,51 ^{Da} | 14,53±2,83 ^{Aa} | 7,43±1,66 ^{Ca} | 14,92±3,36 ^{Ba} | | | | | | | |
| | 5 | 22,43±5,57 ^{Da} | 20,24±0,74 ^{Aa} | 19,57±8,73 ^{Ca} | 7,46±1,00 ^{Ba} | 20,21±1,73 ^{Da} | 17,00±6,06 ^{Aa} | 22,61±8,29 ^{Ca} | 27,35±9,87 ^{Ba} | | | | | | | |
| Bobot ovarium kanan (g) | 0 | 0,13±0,05 ^{Aa} | 0,09±0,04 ^{Aa} | 0,12±0,01 ^{Aa} | 0,10±0,06 ^{Aa} | 0,10±0,04 ^{Aa} | 0,09±0,02 ^{Aa} | 0,11±0,01 ^{Aa} | 0,07±0,01 ^{Aa} | NS | NS | NS | NS | * | NS | NS |
| | 3 | 0,09±0,02 ^{Aa} | 0,08±0,01 ^{Aa} | 0,08±0,02 ^{Aa} | 0,09±0,01 ^{Aa} | 0,11±0,02 ^{Aa} | 0,10±0,01 ^{Aa} | 0,12±0,01 ^{Aa} | 0,11±0,02 ^{Aa} | | | | | | | |
| | 5 | 0,11±0,03 ^{Aa} | 0,11±0,01 ^{Aa} | 0,09±0,01 ^{Aa} | 0,10±0,02 ^{Aa} | 0,10±0,02 ^{Aa} | 0,11±0,03 ^{Aa} | 0,09±0,01 ^{Aa} | 0,13±0,03 ^{Aa} | | | | | | | |
| Bobot ovarium kiri (g) | 0 | 0,11±0,06 ^{ABa} | 0,13±0,03 ^{ABa} | 0,10±0,02 ^{Ba} | 0,09±0,04 ^{Aa} | 0,10±0,03 ^{ABa} | 0,09±0,01 ^{ABa} | 0,11±0,01 ^{Ba} | 0,07±0,03 ^{Aa} | NS | * | NS | NS | NS | * | NS |
| | 3 | 0,07±0,03 ^{ABa} | 0,08±0,03 ^{ABa} | 0,14±0,04 ^{Ba} | 0,07±0,03 ^{Aa} | 0,09±0,02 ^{ABa} | 0,10±0,01 ^{ABa} | 0,14±0,01 ^{Ba} | 0,08±0,00 ^{Aa} | | | | | | | |
| | 5 | 0,08±0,00 ^{ABa} | 0,83±0,04 ^{ABa} | 0,11±0,01 ^{Ba} | 0,11±0,01 ^{Aa} | 0,10±0,01 ^{ABa} | 0,09±0,02 ^{ABa} | 0,12±0,03 ^{Ba} | 0,09±0,04 ^{Aa} | | | | | | | |

A,B,C,D^P < 0.05 perlakuan ekstrak Pelawan ; a,b,c^P < 0.05 lamanya hari pengamatan ;

*P < 0.05; **P < 0.01

¹G. Frekuensi induk melahirkan (melahirkan 1 kali dan 2 kali)

²T. Perlakuan ekstrak Pelawan, yaitu dosis 0, 50, 100, dan 150 mg/kg BB

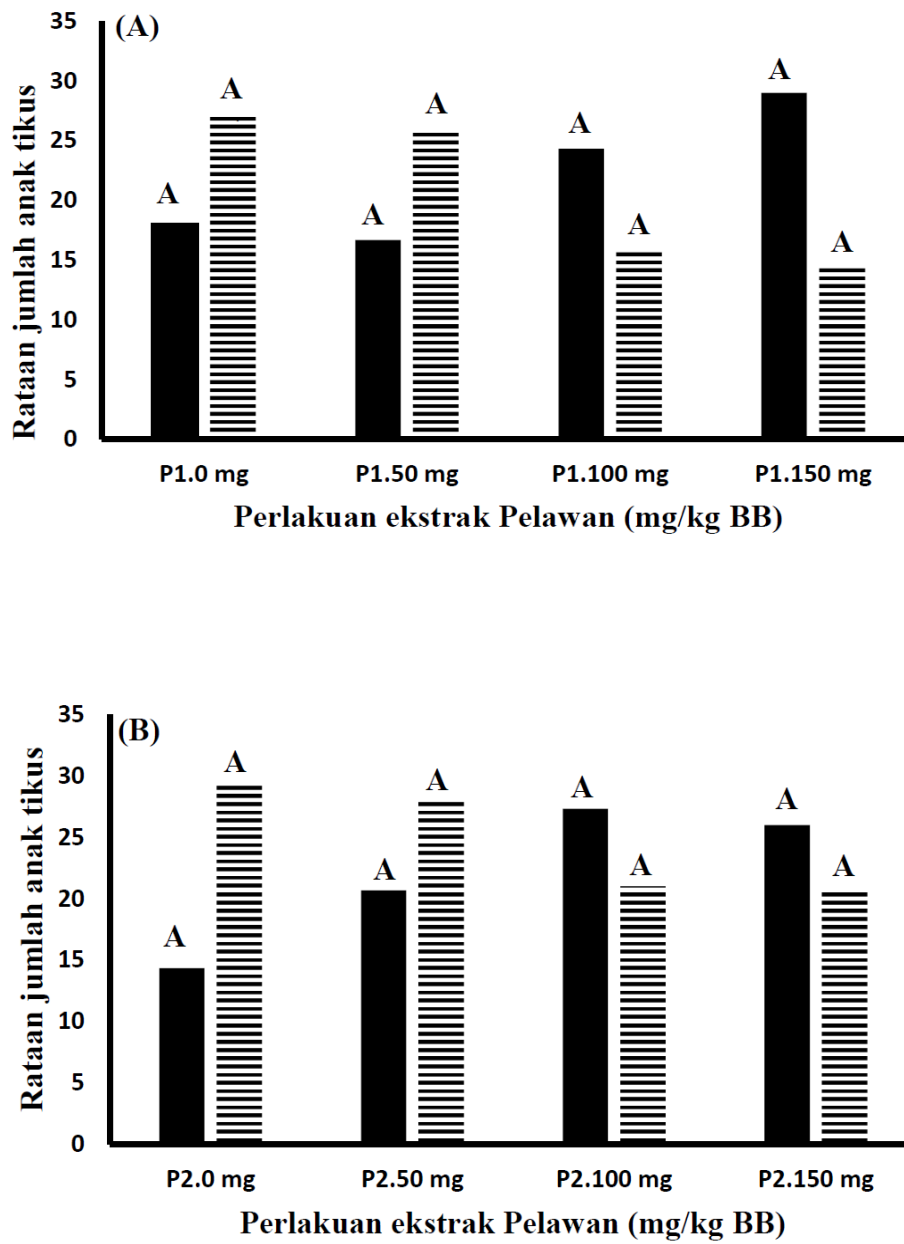
³D. Pengamatan uterus pascamelahirkan, yaitu hari ke-0, ke-3, dan ke-5 pascamelahirkan

⁴GT. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan ekstrak Pelawan

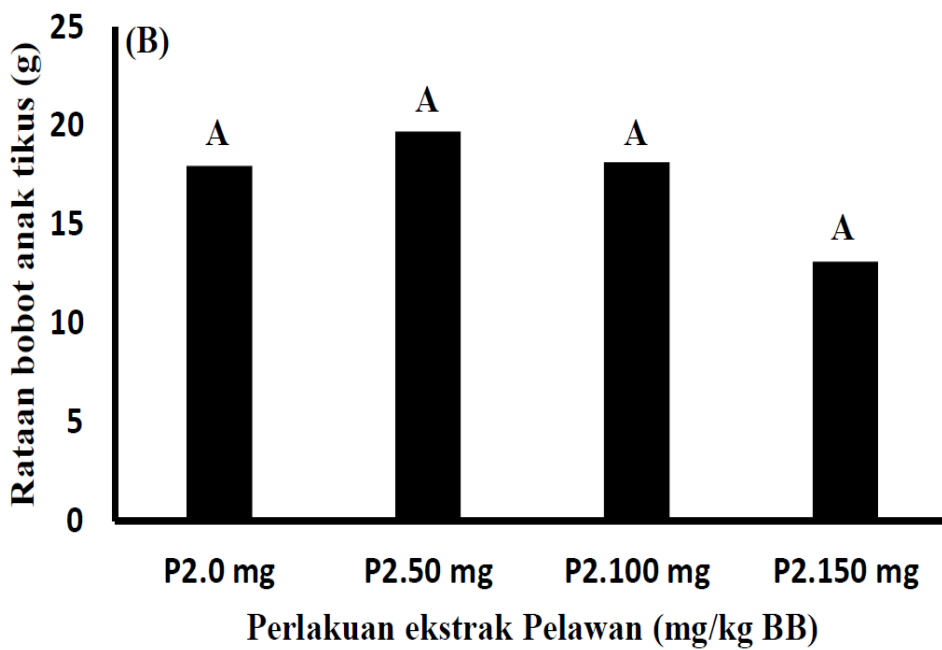
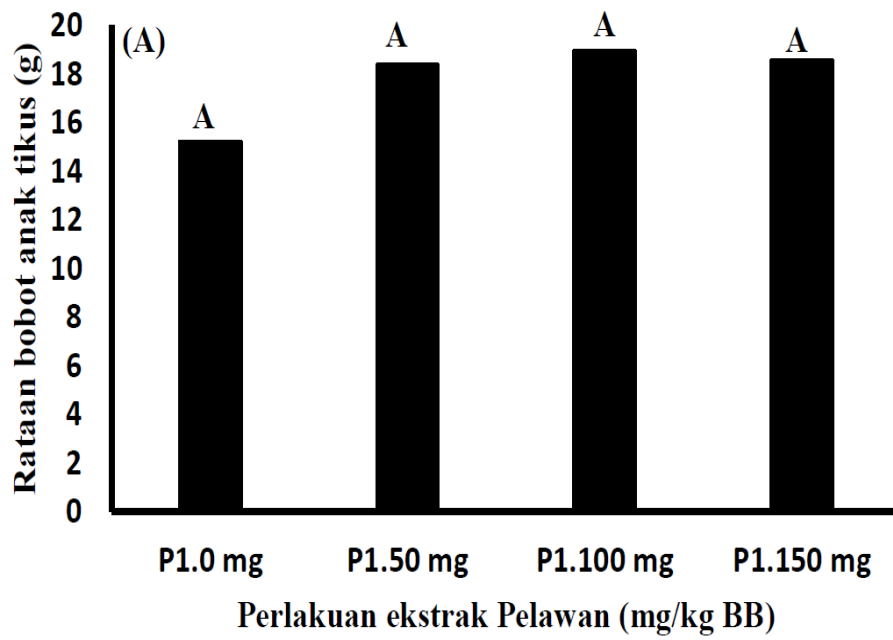
⁵GD. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dengan pengamatan uterus pascamelahirkan

⁶TD. Interaksi antara perlakuan ekstrak Pelawan dengan pengamatan uterus pascamelahirkan

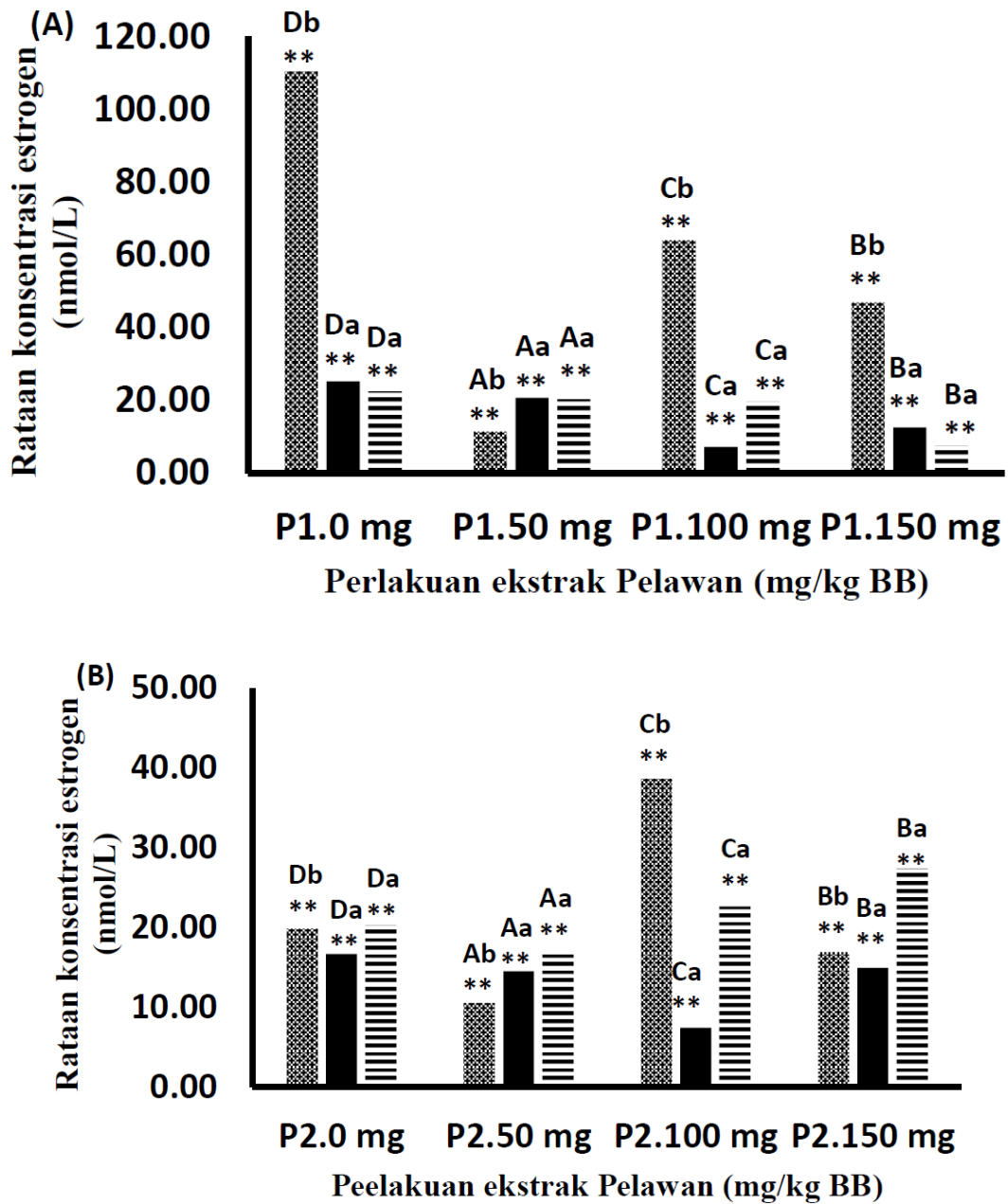
⁷GTD. Interaksi antara frekuensi induk melahirkan dan perlakuan ekstrak Pelawan, dan pengamatan uterus pascamelahirkan



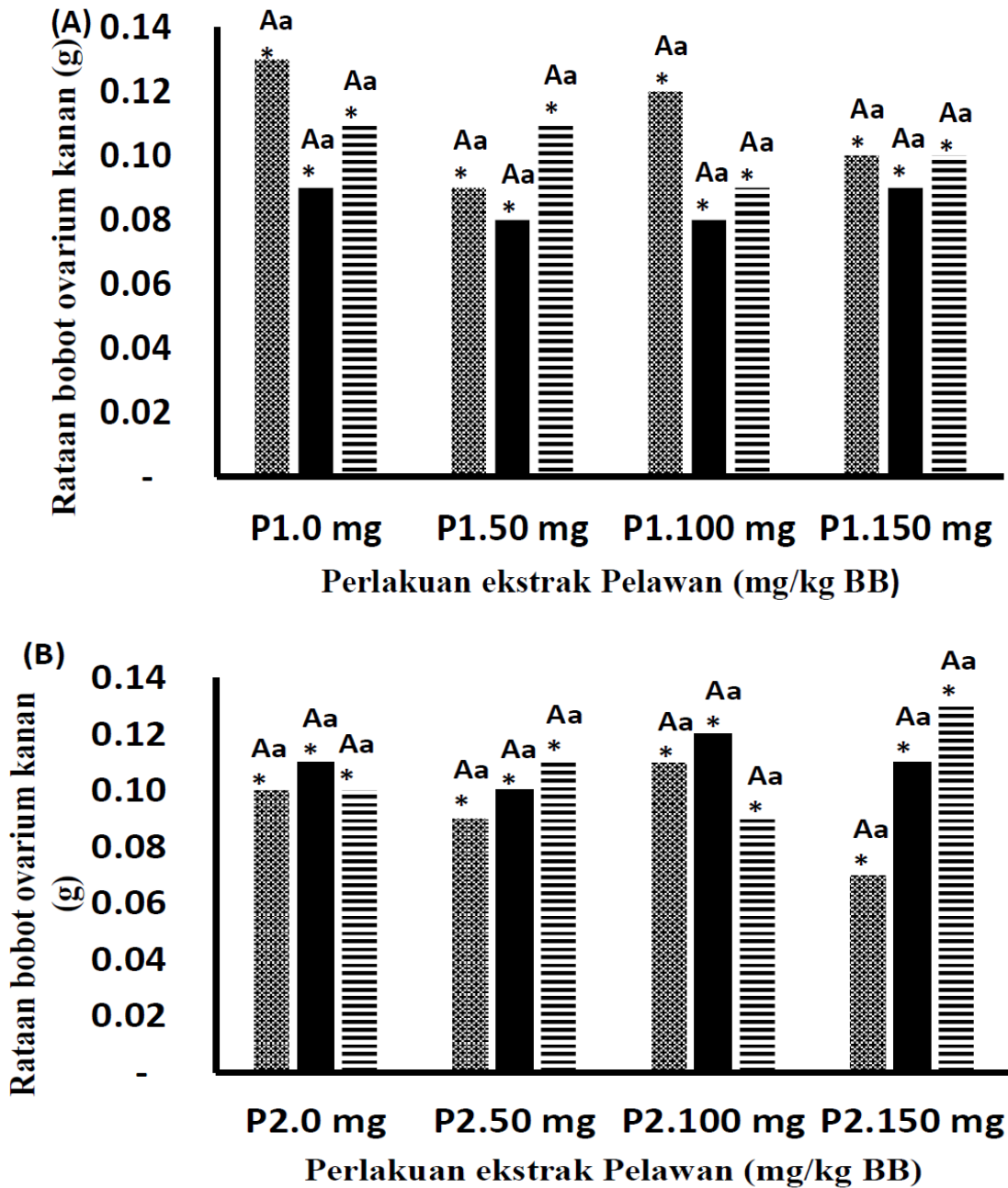
Gambar 1 Diagram batang rata-rata jumlah anak tikus melahirkan 1 kali (A) dan 2 kali (B) akibat pemberian ekstrak fraksi etil asetat Pelawan (■). Jantan (▨). Betina; ^{A,B,C,P} < 0.05 perlakuan ekstrak Pelawan



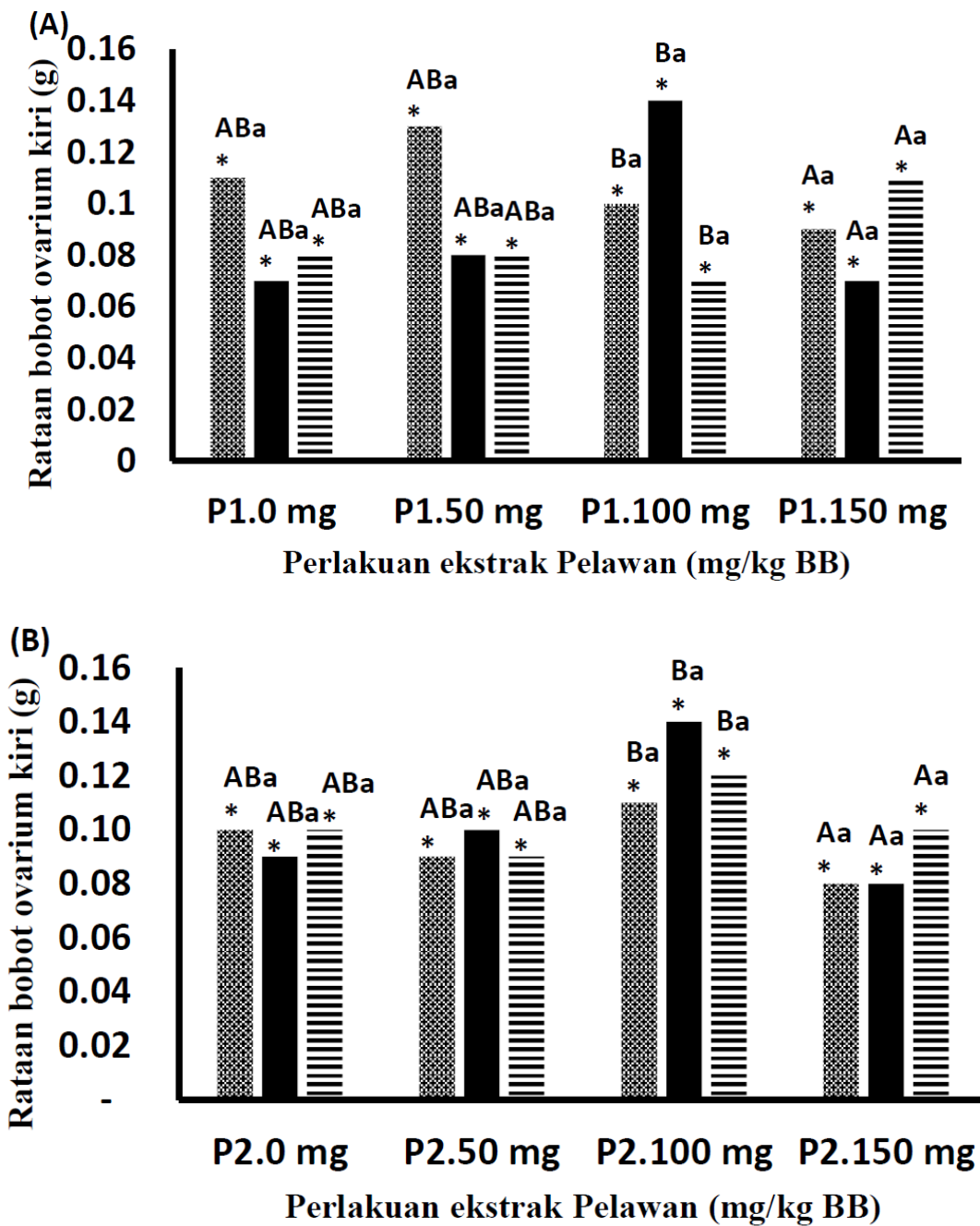
Gambar 2 Diagram batang rataa bobot anak dari induk melahirkan 1 kali (A) dan 2 kali (B) (■). Jantan (☐).
Betina; ^{A,B,C}P < 0.05 perlakuan ekstrak Pelawan



Gambar 3 Diagram batang rataan konsentrasi estrogen pada induk melahirkan 1 kali (A) dan 2 kali (B) pada hari ke-0 (Db), hari ke-3 (Da), dan hari ke-5 (Da) setelah melahirkan. (P1 = induk melahirkan 1 kali; P2 = induk melahirkan 2 kali; A,B,C,DP < 0.05 = perlakuan dosis ekstrak ; a,bP < 0.05 = waktu pemberian ekstrak; **P < 0.01 vs. frekuensi induk melahirkan, vs. perlakuan dosis ekstrak, vs. waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan, vs. antara frekuensi induk melahirkan dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan, vs. antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan dosis ekstrak, vs. antara perlakuan dosis ekstrak dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan, vs. antara frekuensi induk melahirkan dengan perlakuan dosis ekstrak dan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan)



Gambar 4 Diagram batang rerata bobot ovarium kanan pada induk melahirkan 1 kali (A) dan 2 kali (B) pada hari ke-0 (▨), hari ke-3 (■), dan hari ke-5 (≡) setelah melahirkan. (P1 = induk melahirkan 1 kali; P2 = induk melahirkan 2 kali; ^AP < 0.05 = perlakuan dosis ekstrak ; ^aP < 0.05 = waktu pemberian ekstrak; *P < 0.05 vs. antara frekuensi induk melahirkan dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan



Gambar 4 Diagram batang rerata bobot ovarium kiri pada induk melahirkan 1 kali (A) dan 2 kali (B) pada hari ke-0 (▨), hari ke-3 (■), dan hari ke-5 (▤) setelah melahirkan. (P1 = induk melahirkan 1 kali; P2 = induk melahirkan 2 kali; ^AP < 0.05 = perlakuan dosis ekstrak ; ^aP < 0.05 = waktu pemberian ekstrak; *P < 0.05 vs. antara frekuensi induk melahirkan dengan waktu pemberian ekstrak pascamelahirkan

PEMBAHASAN

Jumlah dan bobot anak tikus dari induk melahirkan 2 kali dan pemberian ekstrak Pelawan dengan dosis 50 mg (P2.50 mg) secara oral mengalami peningkatan. Namun, jumlah dan bobot anak tikus mengalami penurunan di dosis 100 mg (P2.100 mg). Peningkatan jumlah anak dan bobot anak berhubungan dengan terjadinya peningkatan kadar estrogen. Peningkatan jumlah fetus yang diahirkan induk sangat berhubungan dengan peningkatan serum estrogen dan progesteron di dalam darah. Peningkatan kadar hormon yang berbeda menunjukkan banyaknya jumlah anak dilahirkan juga berbeda. Demikian juga, peningkatan kadar hormon estrogen di darah induk selama kehamilan akan meningkatkan bobot fetus (Manalu et al., 1996; Sumaryadi & Manalu, 1999). Ekstrak etanol Pelawan telah diujikan secara *in vitro* mengandung senyawa flavonoid (Sartika et al. 2013). Beberapa tanaman yang menghasilkan suatu senyawa sekunder seperti flavonoid dan isoflavon yang memiliki aktivitas estrogenik pada hewan. Tanaman yang bersifat estrogenik disebut fitoestrogen (Morito et al. 2001). Penelitian Zin et al. (2013), pada tikus betina yang diovariectomi diberikan ekstrak tanaman mengandung genestin (fitoestrogen) dosis rendah dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah, dan tikus yang diberikan dengan dosis tinggi akan menurunkan kadar estrogen dalam darah. Pemberian dosis ekstrak genestin tinggi akan meningkatkan ikatan genestin dengan reseptor estrogen (*Estrogen Receptor*) di hipotalamus, yang akan mempengaruhi produksi hormon pertumbuhan (*Growth Hormone*) dan faktor pertumbuhan (*Growth Factor*). Konsentrasi hormon gonad yang bersirkulasi dikontrol oleh *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) di hipotalamus. GnRH menstimulus pelepasan gonadotropin di hipofisis. Kemudian, sekresi gonadotropin akan menstimulus gonad untuk menghasilkan hormon seks, seperti testosteron, estradiol, dan progesteron (Bell, 2018). Konsentrasi hormon estrogen induk melahirkan 1 kali dan 2 kali pada semua perlakuan menunjukkan kadar konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi hormon estrogen pada dosis 100 mg (P1.100 mg dan P2.100 mg), dapat meningkatkan kadar estrogen di darah tikus pascamelahirkan. Peningkatan kadar estrogen di darah tikus akan mempengaruhi sekresi FSH dan LH di pituari menjadi meningkat. Sekresi FSH dan LH mempengaruhi perkembangan sel-sel folikuler di ovarium (Mboso et al., 2013; Amah et al., 2016). Penelitian Adewale et al. (2014) dan Amah et al. (2011, 2012), pada konsentrasi hormon estrogen tikus betina setelah diberikan ekstrak air tanaman

Momordica charantia dengan dosis 12.5 g (6.40 nmol/L), 25 g (10.80 nmol/L), dan 50 g (28.00 nmol/L) mengalami penurunan konsentrasi hormon estrogen. Ekstrak tanaman *M. charantia* dapat menghambat sekresi hormon gonadotropin di pituari, dan juga ekstrak ini dapat merusak atau melisis sel-sel folikuler dan sel-sel teka di jaringan ovarium. Beberapa tanaman memiliki aktivitas estrogenik, yaitu mengandung saponin dan flavonoid dapat berimplikasi menyebabkan gangguan pada siklus estrus pada hewan. Kandungan fitoestrogen dari ekstrak tanaman dapat menstimulasi sekresi GnRH, yang akan meningkatkan sekresi hormon FSH dan LH. Dengan demikian, hormon tersebut akan menstimulus jaringan ovarium dan uterus untuk melepaskan hormon estrogen dan progesteron (Mustapha et al., 2011).

Proses perbaikan kinerja ovarium terlihat pada pemberian ekstrak Pelawan dosis 100 mg (P1.100 mg dan P2.100 mg), diduga kandungan flavonoid yang ada di ekstrak etil asetat Pelawan dapat mempengaruhi jumlah anak, bobot anak, bobot ovarium dan kadar estrogen di darah tikus betina pascamelahirkan. Ekstrak fraksi etil asetat Pelawan yang memiliki kandungan flavonoid beraktivitas fitoestrogenik. Kandungan flavonoid yang memiliki aktivitas estrogenik dapat meningkatkan ekspresi reseptor alfa di darah.. Struktur kimia fitoestrogen mirip dengan struktur kimia 17β -estradiol yang mirip dengan estrogen endogen (Viggiani et al. 2019). Menurut Kostelac et al. (2003) bahwa fitoestrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen alfa dan beta dapat meningkatkan ikatan reseptor estrogen dengan ERE (*Element of Receptor Estrogen*).

Beberapa tanaman yang mengandung fitoestrogen dapat berefek sebagai estrogenik dan anti-estrogenik (Rachun et al., 2007; Amah et al., 2016). Ekstrak tanaman yang mengandung komponen bioaktif flavonoid dan alkaloid dapat menghambat sintesis E_2 (Estradiol). Dengan demikian, hal ini akan mengurangi konsentrasi estradiol di plasma jaringan uterus (Bianco et al., 2006). Ekstrak tanaman mengandung flavonoid dapat berefek estrogenik dan antiestrogenik. Senyawa flavonoid yang bersifat antiestrogenik akan menghambat terjadinya ikatan estrogen dengan reseptor estrogen, dan akibatnya dapat berefek antiproliferasi pada sel (Alice et al., 1998; Wang et al., 1996). Mekanisme estrogen berikatan dengan reseptor estrogen ada dua, yaitu pertama, estrogen berikatan dengan reseptor estrogen di inti pada ligand binding domain (LBD) yang akan memodulasi ekspresi gen di nukleus. Kedua, estrogen berikatan dengan reseptor estrogen α di sitoplasma di mitokondria. Ikatan estrogen dengan reseptor

Tor estrogen α di sitoplasma mitokondria akan membentuk mtDNA yang secara langsung akan memodulasi ekspresi gen di ikatan estrogen dengan reseptor estrogen α -EREs melalui co-regulasi protein (CRs) (Yasar et al., 2016; Alexander et al., 2004).

Peningkatan dan penurunan bobot ovarium dari induk yang diberikan ekstrak fraksi etil asetat Pelawan diakibatkan oleh konsentrasi hormon estrogen dalam tubuh yang berbeda-beda. Diduga, kandungan ekstrak Pelawan memiliki khasiat fitoestrogenik yang dapat mempengaruhi kadar estrogen di dalam tubuh induk. Penelitian pada induk tikus yang diberikan ekstrak kemangi dan ekstrak genestin yang berefek fitoestrogen dapat meningkatkan bobot ovarium (Efendi et al., 2016; Zin et al., 2013). Diduga, peningkatan bobot ovarium berasal dari perkembangan sel-sel mesenkim dan sel-sel folikular di ovarium. Selain itu, peningkatan bobot ovarium dapat terjadi akibat peningkatan kadar cairan berupa transudat dari serum, dan mukopolisakarida yang disekresikan oleh sel-sel granulosa ovarium. Senyawa flavonoid dalam ekstrak tanaman memiliki struktur seperti struktur estrogen endogen. Flavonoid dapat berikatan dengan reseptor estrogen di dalam darah. Flavonoid dapat berikatan kuat dengan reseptor estrogen β (ER β), dan beberapa flavonoid yang lain juga memiliki afinitas kuat mengikat reseptor estrogen α (ER α). Ikatan flavonoid dengan ER α akan memicu efek proses proliferasi sel di jaringan (Satyaningtijas et al. 2014; Xiao et al. 2014; Wu et al. 2019). Senyawa flavonoid Genestin memiliki aktivitas seperti fitoestrogen, dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen di hipotalamus. Banyaknya ikatan senyawa genestin dengan ER (reseptor estrogen) akan mempengaruhi produksi hormon pertumbuhan (Growth Hormone), dan faktor pertumbuhan (Growth Factor). Peningkatan hormon GH dan GF tersebut akan mempengaruhi produksi estrogen di hipofisis yang akan berefek pada perkembangan folikel-folikel di ovarium (Zin et al. 2013).

Reseptor estrogen dapat diaktifkan tanpa adanya ikatan ligan. Ikatan estrogen dan reseptor estrogen melalui jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK), sehingga dapat menghasilkan fosforilasi pada Ser-118 di domain AF-1 dari ER (Xiao et al. 2014). Jalur MAPK cascade adalah jalur pensinyalan pusat yang mengatur berbagai macam proses stimulasi sel, termasuk proliferasi, diferensiasi, apoptosis, dan respons stress (De leeuw et al. 2011). Mekanisme interseluler aksi fitoestrogen yang memiliki struktur yang mirip estrogen endogen (E₂) dapat melalui jalur genom klasik untuk berikatan dengan ER α , ER β di sitoplasma dan nukleus. Beberapa penelitian menemukan fitoestrogen berikatan dengan ER (α

and β) yang berikatan dengan ERs dan menginisiasi transkripsi gen estrogen. Fitoestrogen dapat menstimulus atau menghambat ekspresi protein ER α dan ER β , juga mRNA estrogen di jaringan reproduksi (Dusza et al., 2020).

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah pada pemberian ekstrak etil asetat Pelawan dosis 100 mg (P1.100 mg dan P2.100 mg) efektif mempengaruhi jumlah anak tikus, bobot anak tikus, konsentrasi estrogen, dan bobot ovarium dari induk melahirkan 1 kali dan 2 kali. Pemberian dosis dapat mempengaruhi kinerja ovarium pada tikus betina pascamelahirkan. Diduga, kandungan bioaktif di ekstrak fraksi etil asetat Pelawan bersifat fitoestrogen yang dapat mempengaruhi proses pemulihan kondisi jaringan uterus pascamelahirkan ke kondisi normal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada BUDI-DN, LPDP, RISTEK DIKTI, Republik Indonesia yang telah mendukung penelitian ini.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Alice L, Murkies, Gisela W, and Susan RD. 1998. Phytoestrogen. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83(2): 207-303.
- Alexander H, Olaf P, Dirk K, Gerd M, Alexander W, Birgitt S, Gudrun R, Walter E, and Karl HF. 2004. Dissecting Physiological Roles of Estrogen Receptor α and β with potent selective ligands from structure-based design. *Molecular Endocrinology*. 18(7) : 1599-1609.
- Amah CI, Yma OE, Duru FI, Osinubi AA, Noronha CC, and Okanlawon AO. 2011. Effect of *Momordica charantia* on estrous cycle of Sprague-Dawley rat. *Pac. Journal Med Sci*. 8(1): 38-48.
- Amah CI, Yama OE, and Noronha CC. 2012. Infecund evaluation og cycling female Sparaque-Dawley rats : an aftermath treatment with *Momordica charantia* seed extract. *Middle East Fertil Soc Journal*. 17(1): 37-41.
- Adewale OO, Oduyemi OI, and Oyokunle O. 2014. Oral administration of leaf extracts of *Momordica charantia* affect reproductive hormones of adult female Wistar rats. *Asian Pasific Journal of Tropica*

- Biomedicine*. 4(1):5521-5524.
- Amah. Taria FS, Nwafor CC, Ajah AA, and Bekinbu MT. 2016. Changes in some female reproductive of Albino wistar rats by hydroethanol leaf extract of *fleurya aestuans*. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetries and Gynecology*. 3 (1): 3806-3810.
- Bianco F, Basini G, and Grasselli F. 2006. The plant alkaloid Sanguinarine affects swine granulosa cell activity. *Reproductive Toxicology*. 21 : 335-340.
- Bell MR. 2018. Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*. 159 (7) : 2596–2613. doi:10.1210/en.2018-00220.
- Clarke BL and Khosla S. 2010. Female reproductive system and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 503: 118–128.
- De Leeuw R, Neefjes, J, and Michalides, R. 2011. A Role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *International Journal of Breast Cancer*. 1–10. doi:10.4061/2011/232435.
- Dusza L, Ciereszko R, Skarzyński DJ, Nogowski L, Opałka M, Kamińska B, Nynca A, Kraszewska O, Słomczyńska M, Woclawek-Potocka I, Korzekwa A, Pruszyńska-Oszmałek E, and Szkudelska K. 2020. Mechanism of phytoestrogen action in reproductive processes of mammals and birds. *Reproductive Biology*. 6(1): 151-173.
- Effendi EM, Maheshwari H, dan Gani EJ. 2016. Optimalisasi sediaan konsentrat ekstrak etanol 70 % dan 96 % herba kemangi sebagai fitoestrogen pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Fitofarmaka*. 6(1) : 9-21.
- Ernest ZN, Nadia BA, Daouda K., and Koffi K. 2018. Effects of the aqueous extract of *Cnestis ferruginea* on the histological structure of female rat ovary and uterine horns. *Biomed Journal. Sci & Tech Res*. 2 (1) : 2073-2077. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02. 000625.
- Hamni, Agungpriyono S, Djuwita I, Prasetyaningtyas WE, dan Nasution I. 2010. Karakteristik histologi perkembangan folikel ovarium fase luteal pada kancil (*Tragulus javanicus*). *Indonesian Journal of Veterinary Science & Medicine*. 2(1) : 35-42.
- Kostelac D, Rechkemmer G, and Briviba K. 2003. Phytoestrogens modulate binding Response of Estrogen Receptors α and β to the Estrogen Response Element. *Journal. Agric. Food Chem*. 51: 7632-7635.
- Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, and Bae H. 2015. Significance of antioxidant potential of plant and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*. 11(8): 982-991.
- Leksono WB, Pramesti R, Santosa GW, dan Setyati WA. 2018. Jenis pelarut metanol dan n-heksana terhadap aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Gelidium* sp. dari pantai Drini Gunungkidul-Yogyakarta. *Jurnal Kelautan Tropis*. 21(1):9–16.
- Leksono WB, Pramesti R, Santosa GW, dan Setyati WA. 2018. Jenis pelarut metanol dan n-heksana terhadap aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Gelidium* sp. dari pantai Drini Gunungkidul-Yogyakarta. *Jurnal Kelautan Tropis*. 21(1):9-16.
- Manalu W, Sumaryadi MY, and Kusumorini N. 1996. Effect of fetal number on the concentrations of circulating maternal serum progesterone and estradiol of does during late pregnancy. *Small Ruminant Research*. 23 : 117-124.
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, No-hara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, and Masamune Y. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β . *Biol. Pharm. Bull*. 24(4): 351—356.
- Mustapha AR, Bawa EK, Ogwu D, Abdullahi US, and Kaikabo AA. 2011. Effect of ethanolic extract of *Rhynchosia sublobata* (Schumach) Meikle on estrous cycle in Wistar rats. *International Journal of Med. Arom, Plants*. 1 (2) : 122-127.
- Sumaryadi MY and Manalu W. 1999. Prediction of litter size and lamb birth weight based on the concentrations of some hormones and metabolites in maternal, serum during pregnancy in Javanese thin-tail ewes. *Buletin Peternakan*. 23(2) : 47-60.
- Sartika D, Fitmawati, dan Yusfiati. 2013. Uji *in vitro* tanaman potensial antiurolithiasis .JOM FMIPA. 1-11.
- Skrovankova S, Misurcova L, and Machu L. 2012. Antioxidant activity and protecting health effect of common medical plants. In: Jeyakumar Henry, editor : *Advances in food and nutrition research*. Academic Press. 67 : 75-139.
- Satyaningtyas AS, Maheswari H, Achmadi P, Pribadi WA, Hapsari S, Jondriatno D, Bustamin I, dan Kiranadi B. 2014. Kinerja reproduksi tikus bunting akibat pemberian ekstrak etanol Purwoceng. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8 (1): 35-37.
- Rachun D, Vortherms T, and Seidlova-Wuttke D. 2007. Effects of dietary equol on the pituitary of the ovariectomized rats. *Horm. Metab. Res*. 39 (4) : 256-61.
- Rosdianto AM. 2016. Female reproductive performance of white rat (*Ratus norvegicus* sp) after the administration of fertility herbs. *Thesis*. Bogor Agricultural Institute. Faculty of Veterinary Medicine. Postgraduate Anatomy, Physiology and Pharmacology of Medicine.
- Xiao HH, Fung CY, Mok SK, Wong KC, Ho MX, Wang XL, and Wong MS. 2014. Flavonoids from Herba epimedii selectively activate estrogen receptor

- alpha (ER α) and stimulate ER-dependent osteoblastic functions in UMR-106 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 143 : 141–151. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.02.019 .
- Viggiani MT, Polimeno L, Di Leo A, and Barone M. 2019. Phytoestrogens: dietary intake, bioavailability, and protective mechanisms against colorectal neoproliferative lesions. *Nutrients*. 11: 1-12.
- Wu Y, Hankinson SE, Smith-Warner SA, Wang M, and Eliassen AH. 2019. Flavonoid intake and plasma sex steroid hormones, prolactin, and sex hormone-binding globulin in premenopausal women. *Nutrients*. 11(11): 2669.
- Zin S, Omar S, Khan N, Musameh N, Dass S, and Kasim N. 2013. Effects of the phytoestrogen genistein on the development of the reproductive system of Sprague Dawley rats. *Clinics*. 68(2): 253-262. doi:10.6061/clinics/2013(02)0a21