

## JURNAL METAMORFOSA

### Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

#### Kadar Hormon Estrogen Dan Ketebalan Endometrium Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Ovariectomi Setelah Pemberian Ekstrak Daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit)

#### Estrogene Hormone Levels And Endometrial Thickness Of Female Rat (*Rattus norvegicus*) Ovariectomized After Being Given Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) LEAF Extract

Maria Antonia Margaretha Fernandez<sup>1\*</sup>, Ngurah Intan Wiratmini<sup>2</sup>, Ni Made Rai Suarni<sup>2</sup>

<sup>1,2,3</sup> Program Studi Magister Ilmu Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jl. Raya Kampus Unud, Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali, Indonesia.

E-mail: djannonifer@yahoo.co.id

#### INTISARI

Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) merupakan tanaman yang digunakan sebagai obat dan pakan ternak. Lamtoro mengandung zat aktif dari golongan senyawa steroid, alkaloid, flavonoid, polifenol dan tannin. Zat aktif yang terkandung pada lamtoro bersifat fitoestrogen karena mengandung golongan senyawa steroid, alkaloid dan flavonoid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun lamtoro terhadap kadar hormon estrogen dan ketebalan endometrium tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang telah diovariectomi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan yaitu K- (kontrol negatif diberi minyak jagung), K+ (kontrol positif diberi estrogen sintetik 2 mg), P1 dan P2 diberi ekstrak daun lamtoro sebanyak 200 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB). Masing masing perlakuan terdiri dari 6 ulangan sehingga digunakan 24 ekor tikus betina. Ekstrak daun lamtoro diberikan secara oral sebanyak 2 ml/ekor/hari selama 15 hari. Data yang diperoleh dianalisis dengan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak daun Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) dosis 250 mg/kg BB mampu meningkatkan kadar hormon estrogen serum darah dan ketebalan endometrium tikus betina yang diovariectomi.

Kata kunci: leucaena, ovariectomi, estrogen, endometrium, tikus

#### ABSTRACT

Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) is a plant that is used as a medicine and fodder. Lamtoro contains active biological compound from the classes of steroid, alkaloids, flavonoids, polyphenols and tannins. Biological compound steroid, alkaloid and flavonoid have an estrogen like effect or as phytoestrogen. This study was aimed to investigate the effect of Lamtoro extracts on the estrogen hormone levels and endometrial thickness of Rat (*Rattus norvegicus*) of ovariectomized. This study employed the completely randomized design (CRD) who comprises of 4 treatment groups with 6 replicates. Twentyfour of female ovariectomized rat divided into four groups i.e. K- (control negative, given corn oil), K+ (control positive, given progynova 2 mg) and P1 and P2 (treatment groups of lamtoro leaf extract 200 mg/kg BW and 250 mg/kg BW). Lamtoro leaf extract given by oral at 2 mL/rat/day for 15 days. The data analyzed with *One Way-ANOVA* followed by a test of *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). Results showed that the Lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit)

leaf extract dose 250 mg/kg BW caused increase the levels of estrogen hormone and endometrial thickness.

*Keywords:* leucaena, ovariectomy, estrogen, rat.

## PENDAHULUAN

Menopause merupakan proses penuaan secara alamiah yang terjadi pada wanita usia 40-50 tahun karena aktivitas ovarium menurun sehingga kadar hormon estrogen dalam tubuh menurun (Harlow *et al.*, 2016). Menurut Hormon estrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) dan reseptor estrogen  $\beta$  (ER $\beta$ ) sehingga memicu proliferasi sel pada endometrium pada saluran reproduksi serta payudara. Selain itu, estrogen juga berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya stress oksidatif (Cervellati *and* Bergamini, 2016). Stoicescu (2016) penurunan hormon estrogen menyebabkan terganggunya saluran reproduksi, proliferasi sel epitel kelenjar payudara, transport kolesterol serta modulasi kepadatan tulang.

Gejala menopause yang dialami wanita disebabkan karena rendahnya kadar estrogen adalah tidak teraturnya menstruasi dan berkurangnya berkurangnya lubrikasi vagina (Poomalar *and* Bupathy, 2013). Gejala fisik lainnya yang dialami wanita menopause adalah panas, keringat berlebihan, osteoporosis, berkurangnya elastisitas kulit, jantung berdebar dan inkontensia (Poomalar *and* Bupathy, 2013 dan Doshi *and* Agarwal, 2013). Keluhan psikis yang muncul saat menopause adalah mudah tersinggung, lekas marah, depresi dan susah berkonsentrasi (Bielawska-Batorowicz, 2013).

Salah satu cara untuk mengurangi keluhan akibat menopause adalah dengan melakukan terapi sulih hormon (TSH) dengan memberikan estrogen sintetik. Namun, penggunaan estrogen sintetik dalam jangka waktu lama dapat meningkatkan resiko penyakit kardiovaskuler, kanker payudara dan karsinoma uterus (Stoicescu, 2016 dan Gambacciani *et al.*, 2018). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap potensi tanaman yang mengandung fitoestrogen sebagai alternatif untuk terapi sulih hormon.

Fitoestrogen merupakan derivat tumbuhan yang memiliki cincin fenolik dan gugus hidroksil (OH) dengan jarak antara gugus hidroksilnya adalah 11,0-11,5Å, sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen sehingga memicu proliferasi sel (Patisaul *and* Jefferson, 2010 dan Biben, 2012). Beberapa zat aktif pada tumbuhan yang mempunyai potensi sebagai fitoestrogen adalah golongan senyawa flavonoid (Hassan *et al.*, 2014), alkaloid (Liu *et al.*, 2012), steroid (Fatima *and* Sultana, 2017). Sumber makanan yang mengandung fitoestrogen diantaranya diperoleh dari gandum, kedelai, tahu, wijen, gandum, bawang putih, tauge, aprikot, alfafa, biji bunga matahari, zaitun, almond, kacang hijau, kacang tanah, bawang merah dan beri-berian (Ariyanti dan Apriliana, 2016).

Salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber fitoestrogen adalah lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit). Kandungan golongan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) adalah fenol, alkaloid, flavonoid dan tanin (Hassan *et al.*, 2014 dan Kousalya *and* Jayanth, 2016). Dalam penelitian Hassan *et al.* (2014) ditemukan senyawa dari golongan flavonoid yang bersifat estrogenik berupa isorhamnetin, quercetin dan kaempferol-3-O-rubinoside.

Fitoestrogen dari ekstrak daun lamtoro menyebabkan terjadinya apoptosis sel germinal testis dan penurunan kadar hormon estrogen pada tikus jantan (Marquez *et al.*, 2016). Wiratmini *et al.* (2016) melaporkan bahwa pemberian ekstrak daun lamtoro dengan dosis 1 dan 1,5 gr/kg BB menyebabkan penurunan oosit primer, oosit sekunder, oosit tersier, folikel de graaf dan korpus luteum pada mencit betina. Namun hasil yang berbeda didapat oleh Padmiswari dkk. (2017) bahwa penambahan tepung daun lamtoro hasil perendaman pada ransum sampai aras 22,5% tidak menurunkan

jumlah sel spermatogenik pada histologi testis tikus jantan.

Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun lamtoro terhadap kadar hormon estrogen dan ketebalan endometrium tikus betina yang diovariectomi sebagai model wanita menopause.

## BAHAN DAN METODE

### Pembuatan ekstrak daun lamtoro

Daun lamtoro sedang (tidak terlalu tua atau tidak terlalu muda) yang diperoleh di Desa Serangan Provinsi Bali, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan sampai mencapai berat konstan. Daun lamtoro yang sudah kering diblender dan diayak sehingga menjadi tepung. Tahap selanjutnya adalah proses maserasi yaitu 400 g tepung daun lamtoro direndam dengan 4 L alkohol 96% selama 72 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Maserat yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring. Filtrat dihasilkan kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator* sampai dihasilkan ekstrak kasar berbentuk pasta (Harbone, 1987).

### Uji fitokimia ekstrak daun lamtoro

Uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Nutrisi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana. Uji kualitas ekstrak daun lamtoro untuk mengetahui ada tidaknya kandungan steroid, triterpenoid (Ghosal *and* Mandal, 2012), alkaloid dan saponin (Mojab *et al.*, 2003). Uji kuantitas ekstrak daun lamtoro dengan metode spektrofotometri untuk mengetahui jumlah kandungan flavonoid (Chang *et al.* (2002), tanin (Chaovanalikit *and* Wrolstad, 2004) dan polifenol (Cunnif, 1996).

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan empat perlakuan yaitu K- (kontrol negatif diberi minyak jagung), K+ (kontrol positif diberi estrogen sintetik 2mg), P1 (diberi ekstrak daun lamtoro 200 mg/kg BB) serta P2 (diberi ekstrak daun lamtoro 250 mg/kg BB). Masing masing perlakuan terdiri dari 6

ulangan sehingga digunakan 24 ekor tikus betina.

### Pemberian perlakuan

Dua puluh empat ekor tikus putih betina umur 3 bulan yang telah diovariectomi diaklimatisasi selama 1 minggu. Selama aklimatisasi, tikus diberikan pakan komplit CP 551 (PT. Charoen Pokphan, Indonesia) dan air minum secara *ad libitum*. Ekstrak daun lamtoro diberikan secara oral sebanyak 2 ml/ekor/hari selama 15 hari (Kai *et al.*, 2006).

### Analisis hormon estrogen

Pengambilan sampel darah untuk analisis hormon estrogen dilakukan pada hari ke 16. Tikus dibius menggunakan ketamine dosis 40 mg/kg BB, kemudian darah diambil sebanyak 5 mL melalui sinus orbital menggunakan tabung mikrohematokrit. Darah yang diperoleh ditampung ke dalam tabung vakum yang mengandung EDTA 1,8 mg/mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500-2000 rpm selama 10 menit. Serum yang diperoleh dituang ke dalam tabung microtube 2 mL, dan disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan analisis (Setiadi dkk., 2014). Analisis kadar hormon estrogen dilakukan dengan metode ELISA dengan mengikuti petunjuk dari Rat Estradiol ELISA Kit produksi Cusabio.

### Pembuatan Sediaan Histologi

Setelah pengambilan darah, tikus dikorbankan dengan cara dibius dengan klorofom dan dibedah untuk pengambilan organ uterus (Ridwan, 2013). Organ yang diambil kemudian diletakan dalam cawan petri yang telah berisi larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%). Organ tersebut kemudian dibersihkan dari jaringan ikat dan lemak lalu dikeringkan menggunakan kertas pengisap. Uterus kemudian dimasukkan ke botol kaca dengan larutan fiksatif *Neutral Buffer Formalin* 10%. Pembuatan preparat awetan uterus dilakukan dengan metode parafin, dengan tebal irisan 5  $\mu$ m (Peters, 2003). Hasil preparasi sayatan histologi diamati dibawah mikroskop dan diukur ketebalan endometriunya.

### Analisis Data

Data dianalisis menggunakan program *SPSS For Windows* versi 22. Data diuji dengan dengan *One Way ANOVA*, apabila berbeda nyata ( $p \leq 0,05$ ), maka analisis dilanjutkan dengan uji *duncant multiple range test* (Coster, 2006).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun lamtoro ditemukan golongan

senyawa steroid, alkaloid, flavonoid, polifenol dan tanin (Tabel 1). Beberapa zat aktif pada tumbuhan yang mempunyai potensi sebagai fitoestrogen adalah golongan senyawa flavonoid (Hassan *et al.*, 2014), alkaloid (Liu *et al.*, 2012), steroid (Fatima and Sultana, 2017). Oleh karena itu dalam penelitian ini ekstrak daun lamtoro bersifat fitoestrogen karena mengandung golongan senyawa steroid, alkaloid dan flavonoid.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun lamtoro

Parameter	Metode	Hasil	Kadar
Steroid	Kualitatif	Positif	-
Alkaloid	Kualitatif	Positif	-
Saponin	Kualitatif	Negatif	-
Triterpenoid	Kualitatif	Negatif	-
Flavonoid	Spektrofotometri	Positif	8051,59 mgQE/100g
Polifenol	Spektrofotometri	Positif	13224,89 mgGAE/100g
Tanin	Spektrofotometri	Positif	4085,16 mgTAE/100g

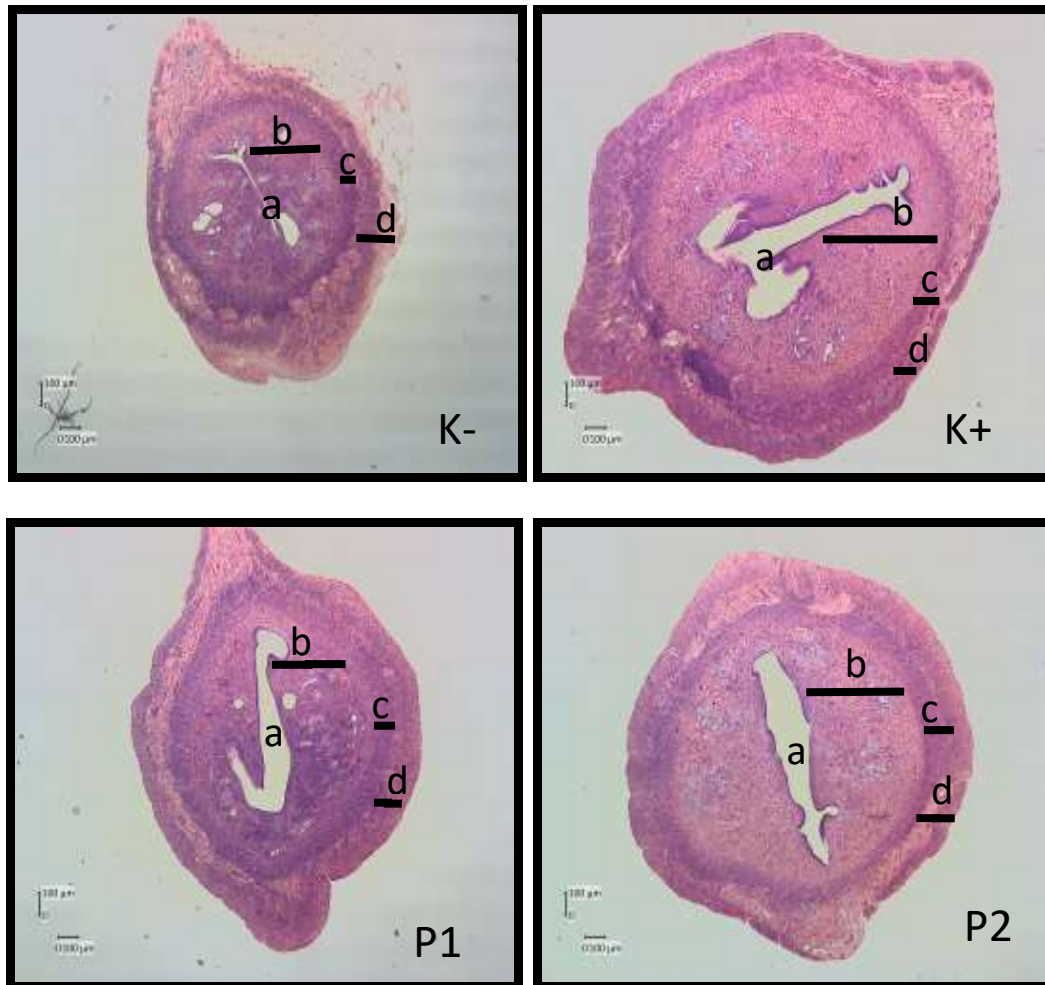
Keterangan: QE: Quercetin Equivalent, GAE: Galac Acid Equivalent, TAE: Tanic Acid Equivalent

Tabel 2. Kadar hormon estrogen serum darah tikus dan ketebalan endometrium tikus setelah pemberian ekstrak lamtoro

Variabel	Perlakuan			
	K-	K+	P1	P2
Kadar Hormon Estrogen (pg/mL)	69,81±3,65 <sup>a</sup>	161,05±18,31 <sup>b</sup>	80,10±6,38 <sup>ac</sup>	103,024±4,75 <sup>c</sup>
Ketebalan Endometrium (µm)	191,22±17,53 <sup>a</sup>	364,12±28,37 <sup>b</sup>	255,75±18,89 <sup>ac</sup>	285,33±29,92 <sup>c</sup>

Keterangan: Huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

K-: Kontrol negatif (minyak jagung), K+: Kontrol positif (Progynova 2mg), P3: Ekstrak Daun Lamtoro 200 mg/kg BB, P4: Esktrak Daun Lamtoro 250 mg/kg BB



Gambar 1.

Struktur histologi uterus tikus yang diberi perlakuan ekstrak daun lamtoro (perbesaran 5 x 10) (Keterangan: K-: kontrol negatif (minyak jagung), K+: kontrol positif (progynova 2mg), P1: (eskrak daun lamtoro 200 mg/kg BB), P2: (eskrak daun lamtoro 250 mg/kg BB), a: lumen, b: endometrium, c: miometrium, d: perimetrium

Menurut Effendi dkk. (2016) fitoestrogen seperti golongan senyawa steroid dapat berubah menjadi estrogen melalui proses aromatase. Fitoestrogen yang masuk ke dalam tubuh, dimetabolisme terlebih dahulu sebelum masuk ke jaringan. Fitoestrogen dari senyawa isoflavon yang dikonsumsi berupa glikosida yang masih bersifat inaktif. Selanjutnya senyawa isoflavon dimetabolisme dengan bantuan enzim glukosidase menjadi genisten dan daidzein yang aktif. Dalam usus melalui sistem enzim yang kompleks dari proses metabolisme, unsur daidzein diaromatisasi menjadi equol dan O desmethyngliolensin (O-DMA) dan genistein menjadi fenol heterosiklik. Equol, O desmethyngliolensin (O-DMA) dan

fenol heterosiklik yang strukturnya mempunyai persamaan dengan hormon estrogen sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen (Bedell *et al.*, 2014).

Hasil penelitian kadar hormon estrogen dan ketebalan endometrium tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang diovariectomi setelah diberi ekstrak daun lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam De Wit) disajikan pada Tabel 2. Struktur histologi uterus tikus yang diberi perlakuan ekstrak daun lamtoro disajikan pada Gambar 1.

Kadar hormon estrogen serum darah dan ketebalan endometrium terendah ditemukan pada perlakuan K- dan berbeda signifikan dengan perlakuan K+ dan P2 (Tabel 2.). Hal ini

disebabkan organ penghasil estrogen pada tikus K- sudah tidak ada karena proses ovariectomi. Menurut Zhou *et al.* (2016) hilangnya ovarium akibat ovariectomi menyebabkan kadar hormon estrogen menurun, sehingga jaringan reproduksi yang memiliki reseptor estrogen menjadi atrofi. Hal ini dibuktikan oleh Raden (2011) bahwa ovariectomi menyebabkan epitel dinding vagina tikus mengalami atrofi. Hartiningsih (2016) dalam penelitiannya melaporkan bahwa tikus yang diovariectomi memiliki konsentrasi estradiol lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang tidak diovariectomi.

Kadar hormon estrogen serum darah dan ketebalan endometrium tertinggi ditemukan pada perlakuan K+ (progynova 2 mg) hasil uji statistik menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan perlakuan K-, P1 dan P2 (Tabel 2.). Pemberian estrogen sintetis (progynova 2 mg) pada tikus ovariectomi dalam penelitian ini mampu meningkatkan kadar hormon estrogen, sehingga sel-sel di endometrium mengalami proliferasi yang menyebabkan peningkatan ketebalan dinding endometrium dan diameter uterus. Pemberian estrogen sintetis dilakukan untuk mengatasi gejala menopause pada manusia (Lemini *et al.*, 2017). Jin *et al.* (2005) membuktikan bahwa pemberian estrogen sintetis (progynova) menyebabkan peningkatan kadar hormon estrogen di dalam darah tikus. Selanjutnya Ateba *et al.* (2013) memberikan estrogen sintetis pada tikus betina ovariectomi menyebabkan peningkatan ketebalan endometrium, epitel vagina dan bobot uterus yang signifikan dibandingkan dengan pemberian ekstrak methanol *Eriosema laurentii*.

Kadar hormon estrogen serum darah perlakuan P1 (80,10 pg/mL) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan K- (69,81 pg/mL), namun hasil uji statistik kadar hormon estrogen perlakuan P1 tidak berbeda signifikan dengan perlakuan K-. Peningkatan kadar hormon estrogen perlakuan P1 menyebabkan peningkatan ketebalan endometrium tikus perlakuan P1. Hal berarti pemberian ekstrak daun lamtoro dosis 200 mg/kg BB yang mengandung fitoestrogen dari golongan senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid mampu

meningkatkan kadar estrogen perlakuan P1, dan mampu menyebabkan proliferasi sel-sel endometrium meskipun hasilnya tidak berbeda signifikan dengan K-.

Dalam penelitian ini, ketika dosis ekstrak daun lamtoro ditingkatkan menjadi 250 mg/kg BB pada perlakuan P2 terjadi peningkatan kadar hormon estrogen dan ketebalan endometrium tikus dan berbeda signifikan dengan perlakuan K-. Peningkatan ini disebabkan kandungan golongan senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid pada dosis ekstrak lamtoro 250 mg/kg BB mengalami peningkatan. Berdasarkan hasil uji fitokimia, maka perhitungan kandungan flavonoid ekstrak daun lamtoro dosis 250 mg/kg BB adalah sebesar 20,12 mgQE 8051,59 mgQE/100 g sampel, sehingga dapat dihitung untuk dosis 200mg/kg dan 250 mg/kgBB adalah sebesar 16,10 mgQE dan 20,12 mgQE. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Biben (2012) bahwa pemberian fitoestrogen dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah.

Fitoestrogen merupakan senyawa aktif pada tumbuhan yang memiliki gugus hidroksil (OH) sehingga mampu berikatan dengan reseptor estrogen (Patisaul *and* Jefferson, 2010). Ikatan antara fitoestrogen dengan reseptor mempengaruhi aktivitas hormonal di dalam tubuh sehingga terjadi pengaktifan reseptor estrogen. Reseptor estrogen yang telah aktif akan berinteraksi dengan *estrogen response element* pada DNA yang terdapat dalam nukleus. Selanjutnya terjadi peningkatan ekspresi gen melalui tahapan transkripsi dan translasi. Ekspresi gen dikatalisis oleh enzim RNA polymerase yang menyebabkan peningkatan mRNA. Pada sisi lain sintesis tRNA juga akan meningkat sehingga pada akhirnya sintesis materi sel menjadi meningkat yang mendukung aktivitas proliferasi sel penyusun endometrium (Junquiera *et al.*, 1998).

Penelitian efek fitoestrogen lain juga dilakukan oleh Fernandez *dkk.* (2015) yaitu pemberian ekstrak daun ekor naga sebesar 100 mg/kg BB pada mencit betina yang telah diovariectomi menyebabkan peningkatan ketebalan endometrium sebesar 38,7% dan peningkatan diameter uterus sebesar 30,3%. Pemberian fraksi air kulit buah delima (*Punica*

*granatum*) dengan dosis 200 mg/kg BB pada tikus ovariektomi menyebabkan peningkatan kadar estradiol dalam darah sebesar  $91,78 \pm 18,382$  pg/mL yang setara dengan pemberian estradiol dan tamoxifen (Qamariah dkk., 2015).

Agustini *et al.* (2017) dalam penelitiannya melaporkan ekstrak buah adas (*Foeniculum vulgare* Mill) dosis 60 mg/200 g BB meningkatkan bobot uterus, diameter terus dan ketebalan endometrium tikus betina prepubertal. Selanjutnya Promprom *and* Chatan, (2018) pemberian ekstrak daun patikan kebo dosis 500 mg/kg BB pada tikus betina ovariektomi menyebabkan peningkatan berat uterus dan ketebalan endometrium yang signifikan.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol daun lamtoro (*Leucaena leucocephala* Lam. De Wit) dosis 250 mg/kg BB mampu meningkatkan kadar hormon estrogen dalam darah dan ketebalan endometrium tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang diovariektomi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, K., D.R. Wilandari, dan L. Rahayu. 2017. Activity of fennel fruit extract (*Foeniculum vulgare* Mill.) on uterine of immature wistar female rat. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 15(2): 186-190.
- Ariyanti, H., dan H. Apriliana. 2016. Pengaruh fitoestrogen terhadap gejala menopause. *Majority*, 5(5): 1-5.
- Ateba, S.B., D. Njamen, S. Medjakovic, S. Hobiger, J.C. Mbanya, A. Jungbauer, and L. Krenn. 2013. *Eriosema Laurentii* De Wild (leguminosae) methanol extract has estrogenic properties and prevents menopausal symptoms in ovariectomized wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1): 298-307.
- Bedell, S., M. Nachtigall, and F. Naftolin. 2014. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 225-236.
- Biben, H.A. 2012. Fitoestrogen: khasiat terhadap sistem reproduksi, non reproduksi dan keamanan penggunaannya. *Prosiding Seminar Ilmiah Nasional Estrogen sebagai Sumber Hormon Alami*. Jogjakarta.
- Bielawska-Batorowicz, E. 2013. The psychology of the menopause: the experiences during the transition and individual conceptualization of menopause. *Nutrition and Diet in Menopause*, 333-345.
- Cervellati, C., and C.M. Bergamini. 2016. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(5):739-753.
- Chang, C.C., M.H. Yang, H.M. Wen, and J.C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Analysis*, 10(3): 178-182.
- Chaovanalikit, A. and R.E. Wrolstad. 2004. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Food Chemistry and Toxicology*, 69(1): 67-72.
- Coster, D.J. 2006. *Testing differences using t-test, anova and nonparametric measures*, USA:University of Alabama.
- Cunniff, P. 1996. *Official method of analysis of aoac international, sixteenth edition vol ii*, Maryland USA: Published by AOAC International Suite.
- Doshi, S.B., and A. Agarwal. 2013. The role of oxidative stress in menopause. *Journal Midlife Health*, 4(3): 140-146.
- Effendi, E, M., H. Maheswari, dan J.E. Gani 2016. Optimisasi sediaan konsentrat ekstrak etanol 70% dan 96% herba kemangi, sebagai fitoestrogen pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kedokteran Unila*, 5(5): 9-22.
- Fatima, L., and A. Sultana. 2017. Efficacy of *Tribulus terrestris* L. (fruits) in menopausal transition symptoms: a randomized placebo controlled study. *Advances in Integrative Medicine*, 4(2): 56-65.

- Fernandez, M.A.M., N.I. Wiratmini, dan G.A.M. Ermayanti. 2015. Pengaruh pemberian ekstrak daun ekor naga (*Rhaphidophor pinnata*, Schott) terhadap perkembangan uterus mencit (*Mus musculus*) betina yang telah diovariectomi. *Jurnal Biologi*, 19(2): 74-79.
- Gambacciani, M., N. Biglia, A. Cagnacci, C. Di-Carlo, S. Caruso, E. Cicinelli, V. Leo, F. Manuela, G. Alesandro, G. Secondo, A. Lanzone, A. Paoletti, N. Russo, F. Vicariotto, P. Villa, and A. Volpe. 2018. Menopause and hormone replacement therapy. The 2017 recommendations of the italian menopause society. *Minerva Ginecologica*, 70(1): 27-34.
- Ghosal, M. and P. Mandal. 2012. Phytochemical screening and antioxidant activities of two selected 'bihi' fruits used as vegetables in darjeeling himalaya. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2): 267-574.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, Bandung: ITB
- Harlow, S. D., M. Gass, J.E. Hall, R. Lobo, P. Maki, R.W. Rebar, and STRAW 10 Collaborative Group. 2012. Executive summary of the stages of reproductive aging workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Menopause*, 19(4): 387-395.
- Hartiningsih, D.A. 2016. Respon Sistem Homeostasis Kalsium Tikus Ovariectomi yang Mengonsumsi Kombinasi Calcitriol dengan Raloxifene. *Jurnal Sain Veteriner*, 34(1): 92-101.
- Hassan, R. A., W.A. Tawfik, and L.M. Abou-Setta, L. 2014. The flavonoid constituents of *Leucaena leucocephala* growing in egypt, and their biological activity. *African Journal Traditional Complementary Alternative Medicine*, 11(1): 67-72.
- Jin, M., F. Jin, L. Zhang, Z. Chen, and H. Huang. 2005. Two estrogen replacement therapies differentially regulate expression of estrogen receptors alpha and beta in the hippocampus and cortex of ovariectomized rat. *Molecular Brain Research*, 142: 107-114.
- Junqueira, L.C., J. Carneiro, and R.G Kelley. 1998. Histologi dasar edisi 8, Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC.
- Kai, O., T. Egle, A. Cisiute, P. Pokk, Osvaldas and N. Timo. 2006. Refinements of intragastric gavage in rats. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 33(4): 243-252.
- Kousalya, P. and V. Jayanthi. 2016. Evaluation of phytochemicals and quantification of phenol, flavonoids and tannins of pods of *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environmental Science*, 16(9): 1561-1564.
- Lemini, C., A.M. Estela, M. Medina, C. Sánchez, A. Figueroa, and M.J. García-Mondragón. 2017. Proliferative properties of 17 $\beta$ -aminoestrogens in MCF-7 human breast cancer cells. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 120(3): 235-242.
- Liu, L., B. Li, Y. Zhou, L. Wang, F. Tang, D. Shao, and Y. Li. 2012. Antidepressant-like effect of fuzi total alkaloid on ovariectomized mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 120(4): 280-287.
- Marquez, S.R., L. Juarez-Rojaz, A. Hernandez, C. Romero, G. Lopez, L. Miranda, A. Guerrero-Aguilera, F. Solano, E. Hernandez, P. Chemieau, M. Keller, and J.A. Delgadillo. 2016. Comparison of the effects of mesquite pod and leucaena extracts with phytoestrogens on the reproductive physiology and sexual behavior in the male rat. *Physiology and Behavior*, 1(164): 1-10.
- Mojab, F., M. Kamalinejad, N. Ghaderi, and H.R. Vahidipour, 2003. Phytochemical screening of some species of iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 77-82.
- Padmiswari, A.A.I., N.I. Wiratmini, dan I.W. Kasa. 2017. Histologi testis tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yang diberi tepung daun lamtoro (*Leucaena Leucocephala*



- Lamk. De Wit) hasil perendaman. *Jurnal Metamorfosa*, 4(2): 178-183.
- Patisaul, H. B., and W. Jefferson. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4): 400-419.
- Peters, S.R. 2003. The art of embedding tissue for frozen section. *Journal of Histotechnology*, 26(1): 11-19.
- Poomalar, G.K., and A. Bupathy. 2013. The quality of life during and after menopause among rural women. *Journal of clinical and diagnostic research*, 7(1): 135-139.
- Promprom and W. Catan. 2018. Estrogenic effect of *Euphorbia hirta* L. extract in ovariectomized rats. *Pharmacognosi Journal*, 10(3): 435-438.
- Qamariah, N., A. Bahtiar, dan Arsianti. 2015. Pengaruh fraksi air kulit buah delima (*Punica granatum* Linn) terhadap kadar estradiol serum tikus ovariektomi. *Jurnal Surya Medika*, 1(1): 30-39.
- Raden, A. 2011. Efek ekstrak pegagan (*Centella Asiatica*) pada *Rattus norvegicus* wistar yang dilakukan ovariektomi terhadap proliferasi epitel pada dinding vagina. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan* 4(1): 71-76.
- Ridwan, E. 2013. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *Journal Indonesian Medical Association*.
- Setiadi, D.R., I. Supriatna, dan M. Agil. 2014. Validasi kit enzyme-linked immunosorbent assay komersial untuk analisis hormon estradiol dan progesteron darah kambing kacang. *Jurnal Veteriner*, 15(4): 446-453.
- Stoicescu, M. 2016. Controversial in menopausal hormone replacement therapy. *Journal of Developing Drugs*, 5(3):1-3.
- Wiratmini, N. I., N.W. Sudatri, and I. Setyawati, I. 2015. The development of ovarian follicle cells and corpus luteum of mice (*Mus Musculus*) swiss webster given *Leucaena leucocephala* leaf extract. *International Journal of Biosciences*, 3: 28-31.
- Zhou, S., L. Zhao, T. Yi, Y. Wei, and X Zhao. 2016. Menopause induced uterine epithelium atrophy results from arachidonic acid/prostaglandin E2 axis inhibition-mediated autophagic cell death. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 6(31408): 1-14.

