

Buku Monograf

EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK SUNKIST

Kajian atas Manfaat pada Histologi ovarium tikus wistar

ISBN: 978-623-7911-14-2

dr. Maya Sari Mufia, MKM, M.
BIOMED, AIFO-K

Unpri Press

**EKSTRAK ETANOL KULIT JERUK SUNKIST KAJIAN ATAS
MANFAAT PADA HISTOLOGI OVARIUM TIKUS WISTAR**

Penulis

dr. Maya Sari Mutia, MKM, M. Biomed, AIFO-K

Editor

dr. Suhartina, MKM

dr. Linda Chiuman, MKM, AIFO-K

dr. Suhartomi, M. Biomed

ISBN

978-623-7911-14-2

Desain Cover

dr. Suhartomi, M. Biomed

Penerbit

Unpri Press

ANGGOTA IKAPI

Redaksi

Jl. Belanga No. 1. Simp. Ayahanda, Medan

Cetakan Pertama

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

**Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan
cara apapun tanpa ijin dari penerbit**

Kata Pengantar

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia dan rahmat yang telah diberikan, sehingga penulisan buku monograf ini dapat diselesaikan.

Buku ini mengupas segala bentuk manfaat dari kulit jeruk Sunkist terhadap Kesehatan reproduksi. Berbagai kandungan fitokimia yang berpotensi sebagai fitoestrogen untuk Kesehatan reproduksi terutama reproduksi wanita. Buku ini secara mendalam menjelaskan peran fitoestrogen pada Kesehatan reproduksi wanita pada beberapa jenis penelitian *in vivo*. Buku ini dilengkapi dengan daftar singkatan dan kerangka konsep pada setiap bab untuk memudahkan dalam memahami isi dari buku ini.

Buku ini diharapkan menambah wawasan dari pembaca untuk lebih memahami manfaat Kesehatan reproduksi dari kulit jeruk Sunkist dan memaksimalkan nilai guna dari kulit jeruk Sunkist. Ucapan terima kasih penulis hanturkan kepada semua pihak yang mendukung penerbitan buku ini.

Seperti kata pepatah "*Tak ada gading yang tak retak*", penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan buku monograf ini dan masih jauh dari kata sempurna. Karena kesempurnaan hanya milik Tuhan Yang Maha Esa, sehingga kritik dan saran yang membangun terkait penulisan buku monograf ini sangat penulis harapkan.

Medan, Februari 2021

Penulis

dr. Maya Sari Mutia, MKM, M. Biomed, AIFO-K

Daftar Isi

Kata Pengantar.....	i
Daftar Isi	ii
Daftar Gambar.....	iv
Daftar Tabel.....	v
1. Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penulisan	4
2. Masalah Infertilitas	5
2.1. Infertilitas	5
2.2. Gangguan pada Ovulasi Menyebabkan Infertilitas	7
2.3. Penangan Infertilitas.....	7
3. Fitoesterogen.....	9
3.1. Definisi.....	9
3.2. Klasifikasi	9
3.3. Manfaat Fitoesterogen.....	10
4. Siklus Estrous	11
5. Ovarium	12
5.1. Anatomi Ovarium.....	12
5.2. Histologi Ovarium	12
5.3. Fisiologi Ovarium	14
6. Esterogen	17
7. Jeruk Sunkist	19
8. Karakteristik Sampel Jeruk Sunkist.....	21
8.1. Kerangka Konsep	21
8.2. Cara Kerja.....	21
8.3. Hasil Penelitian.....	23
9. Peran Fitoesterogen pada Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist terhadap Siklus Estrus Tikus Wistar.....	25
9.1. Kerangka Konsep	25
9.2. Cara Kerja.....	25

9.2.1.	Pembuatan suspensi oral	25
9.2.2.	Perlakuan pada Hewan Coba.....	26
9.2.3.	Pengambilan Apusan Vagina	27
9.2.4.	Pewarnaan Giemsa pada Apusan Vagina.....	27
9.2.5.	Evaluasi Apusan Vagina	28
9.3.	Hasil Penelitian.....	28
10.	Peran Fitoestrogen terhadap Esterogen Serum dan Jaringan Ovarium Tikus	33
10.1.	Kerangka Konsep	33
10.2.	Cara Kerja.....	34
10.2.1.	Pembuatan suspensi oral	34
10.2.2.	Perlakuan pada Hewan Coba.....	35
10.3.	Hasil Penelitian.....	37
10.3.1.	Estimasi Kadar Estradiol Serum	37
10.3.2.	Estimasi Perkembangan Folikel.....	37
11.	Penutup.....	42
12.	Daftar Pustaka	44
	Biografis Penulis.....	47

Daftar Gambar

No. Gambar	Keterangan Gambar	Halaman
1.	Persentase Terjadinya Kehamilan pada Pasangan Suami Istri pada Usia 20-25 Tahun	2
2.	Perbandingan Struktur Kimia E2 dan Fitoestrogen.....	10
3.	Gambaran Makroskopis Ovarium	12
4.	Gambaran Mikroskopis Ovarium (Perbesaran Sedang). Pewarnaan: HE.....	14
5.	Gambaran proses Oogenesis.....	15
6.	Siklus Menstruasi	16
7.	Struktur Esterogen	17
8.	Ringkasan Dari Sintesis Estrogen Glandular	Error! Bookmark not defined.
9.	Bagian-Bagian <i>Citrus sinensis</i>	19
10.	Kerangka Konsep.....	21
11.	Kerangka Konsep.....	25
12.	Gambaran Apusan Vagina Proestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan).....	29
13.	Gambaran Apusan Vagina Estrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan).....	30
14.	Gambaran Apusan Vagina Metestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan).....	30
15.	Gambaran Apusan Vagina Diestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan).....	30
16.	Kerangka Konsep.....	33
17.	Proses Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist.....	34
18.	Intervensi Hewan Coba.....	35
19.	Proses Pengambilan Jaringan dan Serum dari Hewan Coba	36
20.	Gambaran Umum Ovarium Tikus: (A) Korteks dan Medula Ovarium (Perbesaran: 40x) dan (B) Korteks Ovarium (Perbesaran: 100x). Bagian Longitudinal. Stain: Pewarnaan HE	39
21.	Folikel de Graff: (A) Perbesaran 100 x diperbesar dan (B) Perbesaran 400x. Potongan Longitudinal. Stain: Pewarnaan HE.....	40

Daftar Tabel

No. Tabel	Keterangan Tabel	Halaman
1.	Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist.....	24
2.	Kelompok Perlakuan Tikus.....	26
3.	Interpretrasi Gambaran Apusan Vagina Tikus Wistar Betina	28
4.	Panjang Total dan Masing-Masing Siklus Estrus pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan.....	28
5.	Gambaran Mikroskopis Apusan Vagina Beberapa Tikus Wistar Betina pada Masing-Masing Fase.....	Error! Bookmark not defined.
6.	Panjang Fase-Fase pada Siklus Estrus	30
7.	Kelompok Perlakuan Tikus.....	35
8.	Analisis Kadar Serum Estradiol pada Semua Kelompok Intervensi.....	37
9.	Analisis Persentase Folikel di Semua Kelompok Intervensi.....	38

1. Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Pada masa puber, folikel-folikel primer yang mengandung oosit primer di ovarium akan mengalami meosis tahap kedua untuk membentuk badan polar dan ovum yang akan di keluarkan untuk konsepsi pada masa ovulasi. Normalnya, terdapat cadangan folikel sebanyak 300.000 folikel pada ovarium namun, hanya 400 folikel yang akan matang dan berovulasi sedangkan sisanya 99,97% tidak akan berovulasi dan akan mengalami atresia. (Sherwood, 2013)

Selama masa puber, proses ovulasi dipengaruhi oleh berbagai hormon diantaranya adalah hormon FSH, LH, esterogen, dan progesteron. Pada tingkat ovarium, hormon yang berperan dominan sebelum terjadinya ovulasi adalah hormon esterogen, sedangkan setelah ovulasi adalah hormon progesteron. Normalnya kadar esterogen pada masa sebelum menopause atau premenopuase adalah 30-400 pg/ml sedangkan pada usia postmenopausal adalah antara 0-30 pg/ml. (Sherwood, 2013; Simon, Chang and Cherney, 2013)

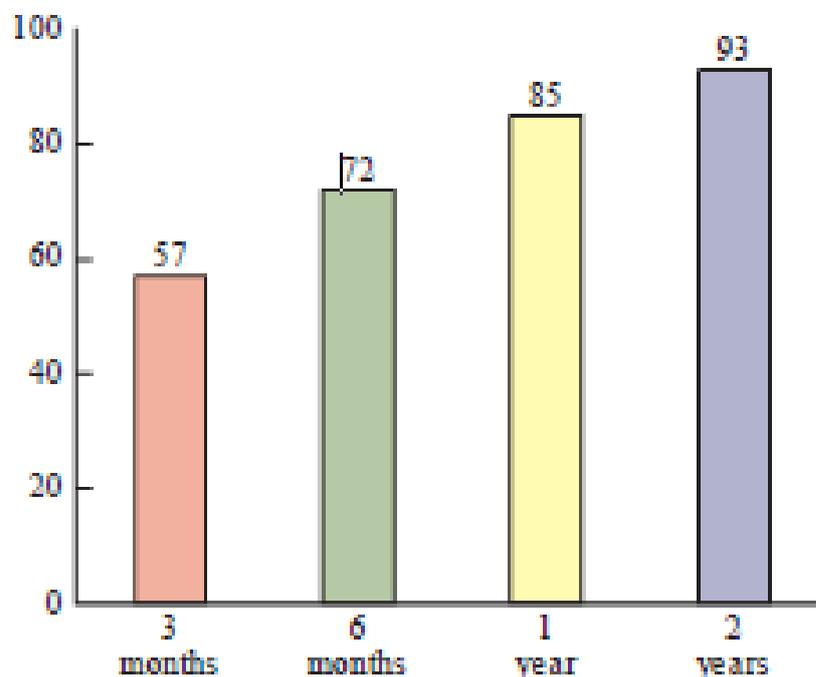
Infertilitas merupakan masalah umum yang sering dijumpai saat ini, hal ini dapat dilihat dari laporan-laporan terbaru yang menyatakan prevalensi infertilitas adalah 9 hingga 18% pada populasi umum. Pada tahun 2008, 61,430 neonatus dihasilkan dari bantuan teknologi reproduksi (Assited Reproductive Techonology/ART). (Hanson *et al.*, 2017)

Secara global sekitar 15% pasangan suami istri secara global mengalami infertilitas sekitar 48,5 juta pasangan. Sekitar 17% dari pasangan yang tinggal di negara industri dilaporkan membutuhkan penanganan terkait dengan infertilitas, yang dapat disebabkan oleh kegagalan ovulasi, kerusakan tubal atau endometriosis, atau

karena jumlah hitung sperma yang rendah. (Bhattacharya *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2015)

Di Amerika Serikat angka kejadian Infertilitas pada perempuan melalui review beberapa journal 15 tahun terakhir menunjukkan bahwa angka kejadian ini terus meningkat, hal ini terlihat dari 11% wanita pada usia 15-44 tahun mengalami kegagalan dalam mengalami kehamilan atau melahnfertilitas pada usia 15-49 tahun irkan bayi yang a term. (Place, 2016)

Badan Pusat Statistik (BPS) pada tahun 2011 menyatakan bahwa terdapat kurang lebih 39.8 juta wanita berada pada usia produktif, namun 10-15 persen diantaranya infertile. (Sa'adah and Purnomo, 2016)



Gambar 1: Persentase Terjadinya Kehamilan pada Pasangan Suami Istri pada Usia 20-25 Tahun (Hoffman *et al.*, 2016)

Terdapat beberapa faktor yang dapat menyebabkan terjadi infertilitas namun sekitar > 70% infertilitas berasal dari faktor perempuan. Infertilitas pada perempuan dapat disebabkan dari ovarium, tuba, uterus, hipotalamus, hipofisis, ataupun karena penyakit sistemik. Dari penyebab-penyebab tersebut 27% berasal dari masalah ovulasi, dimana bisa disebabkan oleh kegagalan ovulasi yang bersifat

bawaan atau akibat gangguan keseimbangan hormone. (Sharma *et al.*, 2011; Hestiantoro *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2015; Hoffman *et al.*, 2016)

Sebagai alternatif dari beberapa kasus infertilitas tersebut terutama pada perempuan adalah fitoesterogen yang merupakan senyawa di alam yang diperoleh dari tumbuhan dan memiliki struktur yang mirip dengan 17- β -Estradiol (E2) yang merupakan hormon seksual utama perempuan. Fitoesterogen yang umum dijumpai adalah dalam bentuk isoflavone, prenylflavonoid, coumestans, dan ligans. (Rietjens, Lousse and Beekmann, 2017)

Pada ekstrak etanol kulit Jeruk Sunkist (*Citrus sinensis L. Osbeck*) mengandung kandungan fitokimia berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan terpenoids. Dimana beberapa derivat dari flavonoid dapat bersifat fitoesterogen. (Oikeh, Oriakhi and Omoregie, 2013; Rietjens, Lousse and Beekmann, 2017)

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, infertilitas merupakan masalah yang sangat penting di masyarakat dan perlu perhatian khusus. Mengingat salah satu tujuan Universitas Prima Indonesia untuk menciptakan penelitian dibidang kesehatan keluarga dan komunitas yang menjadi rujuk nasional maupun internasional melalui pendanaan baik dari dalam maupun luar negeri, dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan kulit jeruk dapat menjadi solusi terhadap masalah infertilitas di komunitas.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan urian latar belakang di atas didapati rumusan masalah berupa:

- a. Bagaimana pengaruh kandungan fitoesterogen dalam kulit jeruk sunkist pada siklus estrus tikus wistar betina?
- b. Bagaimana pengaruh kandungan fitoesterogen dalam kulit jeruk sunkist pada kadar estrogen serum tikus wistar betina?
- c. Bagaimana pengeruh kandungan fitoesterogen dalam kulit jeruk sunkist pada histologi jaringan ovarium tikus wistar betina?

1.3. Tujuan Penulisan

Tujuan dari penulisan buku ini disusun untuk menjawab rumusan masalah dalam penelitian ini. Adapun tujuan tersebut meliputi:

- a. Mengetahui efek dari ekstrak kulit jeruk Sunkist pada dosis 300 mg/kgBB, 450 mg/kgBB. Dan 600 mg/kgBB terhadap kadar esterogen serum pada tikus wistar betina.
- b. Mengetahui efek dari ekstrak kulit jeruk Sunkist pada dosis 300 mg/kgBB, 450 mg/kgBB. Dan 600 mg/kgBB terhadap histologi jaringan ovarium pada tikus wistar betina.

2. Masalah Infertilitas

2.1. Infertilitas

Infertilitas didefinisikan sebagai ketidakmampuan dalam mengandung setelah satu tahun melakukan hubungan seksual tanpa proteksi dengan frekuensi yang proporsional. Infertilitas dapat dibagi menjadi infertilitas primer yang tidak pernah mengalami kehamilan dan infertilitas sekunder yang merujuk pada infertilitas yang diikuti setidaknya dengan satu kali konsepsi sebelumnya. (Sharma *et al.*, 2011; Hanson *et al.*, 2017)

Keberhasilan dalam mengandung membutuhkan rangkaian kompleks yang melibatkan ovulasi, pengambilan ovum oleh tuba falopii, fertilisasi, transpor ovum yang telah dibuahi ke dalam uterus, dan implementasi ke dalam cavum uteri. Tidak hanya pada perempuan, pada laki-laki kalitas dan kuantitas sperma yang adekuat harus terdeposit ke sekitar uterus pada saat ovulasi. Berikut ini adalah insiden infertilitas berdasarkan etiologi.

Tabel 1: Etiologi dari Infertilitas

Etiologi	Persen
Laki-laki	25%
Ovulasi	27%
Tuba/uterus	22%
Yang lainnya	9%
Tidak dapat dijelaskan	17%

Sumber: (Hoffman *et al.*, 2016)

Berikut ini adalah beberapa penyebab tersering infertilitas yang dijumpai pada perempuan: (Sharma *et al.*, 2011)

- a. **Kelaianan pada Ovulasi.** Kelainan-kelainan pada tuba paling sering disebabkan karena ketidak seimbangan hormon (FSH, LH, esterogen, dan progesteron).

- b. **Kegagalan Ovarium.** Kelainan ini dapat disebabkan karena penyakit tertentu (Sindroma turner) atau pengobatan tertentu (untuk tumor ovarium) yang disebabkan oleh agen kemoterapi atau radioterapi.
- c. **Endometriosis,** Keadaan dimana terjadi ketidaknormalan pada pelapis dinding uterus. Pertumbuhannya diluar saluran reproduksi dan menyebabkan sumbatan pada tuba falopi dan menyebabkan infertilitas pada 10% wanita.
- d. **Kelainan pada Uterus dan Serviks.** Pertumbuhan tumor jinak seperti fibroid pada dinding uterus dapat mengganggu proses nidus emrio pada dinding uterus dan menyebabkan masalah pada konsepsi.
- e. **Abnormalitas pada bentuk Serviks.** Perubahan tekstur dari mukosa serviks menyebabkan pergerakan sperma dari vagina ke uterus sangat sulit.
- f. **Usia.** Dengan bertambahnya usia kemampuan seorang wanita untuk mengandung dan mempertahankan kehamilan semakin sulit, karena saat wanita dilahirkan, jumlah folikel sudah ditetapkan sehingga dengan bertambah usia jumlah ovum yang dilepaskan akan mengurangi jumlah folikel yang ada dan semakin menurunkan kualitas dari ovumm.
- g. **Polikistik Ovarium.** Keadaan dimana terdapat kista multiple didalam ovarium. Wanita dengan PCOS (Polycystic Ovaries Syndrome) tidak dapat mengalami ovulasi.
- h. **Kelainan Immunologis.** Bisa terdapat antibodi tertentu pada mukosa serviks wanita yang menghancurkan sperma. Selain itu bisa juga dijumpai adanya autoantibodi pada tubuh yang menyerang organ tubuh tertentu, termasuk didalamnya ovarium.
- i. **Penyebab-Penyebab pada tuba.** Kelainan pada tuba bisa disebabkan virus ataupun bakteri dan biasanya merupakan IMS. Infeksi-infeksi ini umumnya menyebabkan inflamasi yang menyebabkan kerusakan pada tuba dan terbentuknya jaringan parut (*Hydrosalpinx*).

- j. **Menopause Dini**
- k. **Kelainan Koagulasi**

2.2. Gangguan pada Ovulasi Menyebabkan Infertilitas

Abnormalitas genetik (*Turner's syndrome*) dan ketidak-seimbangan hormon berhubungan dengan anovulasi kronis. Hal ini dapat disebabkan karena rendahnya kadar LH dan FSH yang menyebabkan rendahnya kadar esterogen dan progesteron. Pada beberapa wanita, anovulasi dapat bermanifestasi melalui tingginya kadar FSH yang mengindikasikan kegagalan ovarium primer. (Bhattacharya *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011)

2.3. Penangan Infertilitas

Pada wanita dengan kelainan ovulasi, klomifen dan metformin meningkatkan terjadinya ovulasi dan kehamilan. Terdapat bukti ilmiah yang menyatakan bahwa terdapat efikasi yang serupa antara tamoksifen dengan klomifen, namun penelitian klinis random acak mengenai efikasi tamoksifen masih belum ada. Sehingga sekarang tamoksifen jarang digunakan. Klomifen bekerja dengan menghambat umpan balik negatif dari estradiol terhadap hipotalamus atau pituitari, yang mendorong sekresi FSH endogen. (Bhattacharya *et al.*, 2010; Ghadir, Ambartsumyan and DeCherney, 2013)

Inhibitor aromatase letrozole merupakan alternatif bagi pasien yang tidak merespon dengan pemberian klomifen. Letrozole bekerja dengan menghambat biosintesis esterogen, sehingga melepaskan hipotalamus atau pituitari dari umpan balik negatif dan meningkatkan sekresi FSH endogen. (Ghadir, Ambartsumyan and DeCherney, 2013)

Gonadotropin dapat meningkatkan kemungkinan untuk hamil tetapi meningkatkan risiko *Ovarian Hyperstimulation Syndrome* (OHSS) dan kehamilan multipel. Selain itu penggunaan obat ini memerlukan pemantauan terhadap kadar

estradiol dan monitoring dengan ultrasonografi. Sehingga obat ini memakan waktu dan lebih mahal dibandingkan dengan klomifen dan letrozole. (Bhattacharya *et al.*, 2010; Ghadir, Ambartsumyan and DeCherney, 2013)

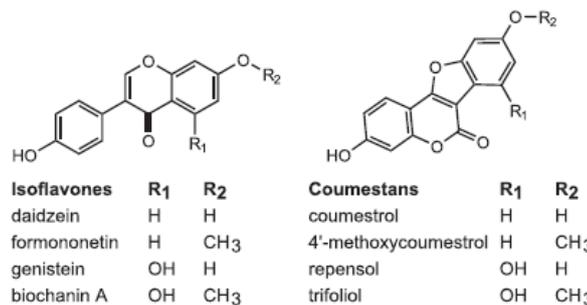
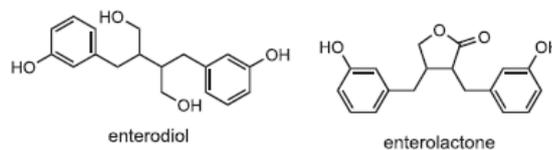
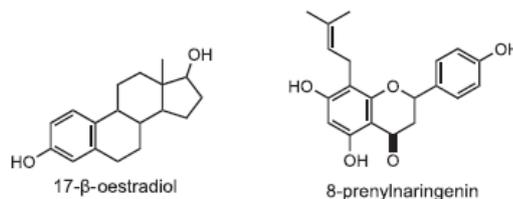
3. Fitoestrogen

3.1. Definisi

Fitoestrogen adalah senyawa nabati, yang ditemukan dalam berbagai makanan, terutama kedelai. Senyawa-senyawa tersebut mewakili berbagai kelompok bahan kimia yang terjadi secara alami dengan kemiripan struktural dengan 17- β -estradiol (E2), hormon seksual utama pada perempuan. (Rietjens, Louisse and Beekmann, 2017). Sumber fitoestrogen banyak tersebar di daerah Asia termasuk Indonesia. (Desmawati and Sulastri, 2019)

3.2. Klasifikasi

Terdapat empat kelas dari fitoestrogen yang berasal dari senyawa fenol meliputi isoflavones, stilbene, coumestan, dan lignan serta prenylflavonoids. Berikut ini perbandingan struktur senyawa estradiol dengan fitoestrogen.



Gambar 2: Perbandingan Struktur Kimia E2 dan Fitoestrogen (Rietjens, Louisse and Beekmann, 2017)

3.3. Manfaat Fitoestrogen

Adapun beberapa manfaat fitoestrogen terhadap kesehatan meliputi kesehatan reproduksi, kesehatan jantung, berperan dalam menurunkan berat badan, tumor yang berkaitan dengan hormon, kesehatan kulit dan tulang, serta sistem imun tubuh. (Desmawati and Sulastri, 2019)

4. Siklus Estrous

Siklus estrous merupakan siklus reproduksi utama pada spesies betina dari vertebrata non-primata. Siklus tipikal pada mamalia dari siklus estrous meliputi: proestrus, estrus, metestrus, diestrus, dan anestrus. Pada tikus siklus estrous (proestrus-diestrus) akan berulang setiap 4 sampai 5 hari sekali kecuali jika terjadi intrupsi karena kehamilan, kadang menyerupai kehamilan, dan anestrus.

Tabel 2: Klasifikasi Dasar dari siklus estrous berdasarkan tipe sel dan jumlah relatif tipe sel dari apusan vagina [15]

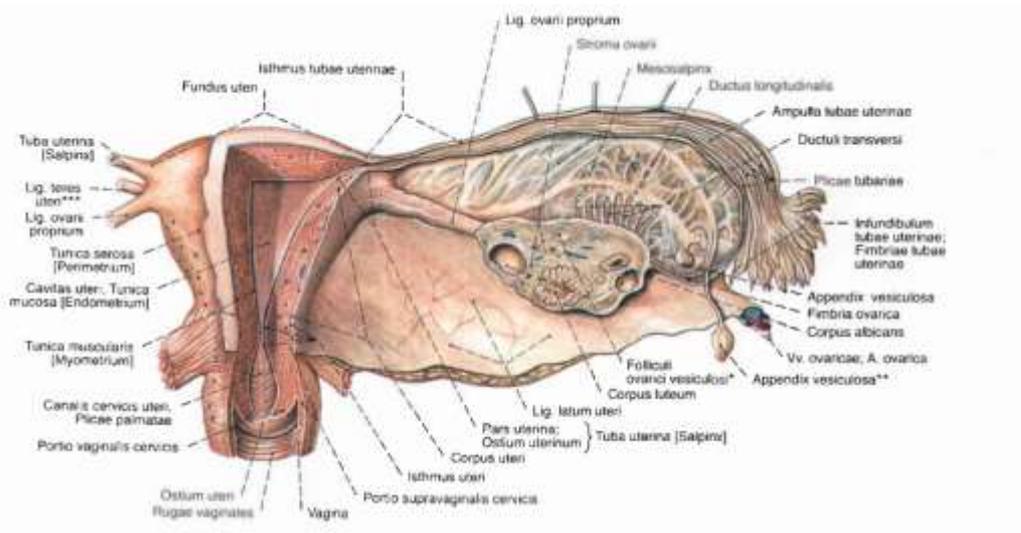
Fase	Neutrofil	Sel Epitel Kecil Berinti	Sel Epitel Besar Berinti	Sel epitel tanpa nukleus terkeratinisasi	Densitas Relatif
Proestrus	0 sampai +	++ sampai +++	0 sampai +	0 sampai +	Redah – sedang
Estrus					
Tikus	0 sampai +	0 sampai ++	0 sampai ++	++ sampai +++	Sedang- tinggi
Mencit	0 sampai +	0 sampai +	0 sampai +	++ sampai +++	Sedang- tinggi
Metestrus					
Tikus	+ sampai +++	+ sampai ++	+ sampai ++	+ sampai +++	Sedang – tinggi
Mencit	+ sampai +++	0 sampai +	0 sampai +	++ sampai +++	Sedang – tinggi
Diestrus	++ sampai +++	+ sampai ++	+ sampai ++	0 sampai +	Rendah – sedang

NB: 0 = Tidak ada; + = sedikit; ++ =sedang; +++ = banyak

5. Ovarium

5.1. Anatomi Ovarium

Ovarium merupakan sepasang organ berbentuk kacang (*Bean-Shaped*) yang masing-masing strukturnya disokong oleh mesentri yang disebut sebagai mesovarium, ligamentum suspensorium lateral, dan ligament ovarium. Ligamentum suspensorium lateral berisi pembuluh darah, struktur limfatik, dan plexus saraf. Masing-masing ovarium memiliki panjang antara 2.5-5 cm, lebar 0.7-1.5 cm, dan berat antar 4-8 gram. (Mohan, 2010)



Gambar 3: Gambaran Makroskopis Ovarium (Paulsen and Waschke, 2012)

5.2. Histologi Ovarium

Secara histologi, ovarium dibungkus oleh epitel *coelomic*. Sementara itu ovarium itu sendiri terdiri dari korteks pada bagian luar dan medulla pada bagian dalam. (Mohan, 2010)

- Epitel coelomic/ germinativum* merupakan lapisan epitel yang membungkus ovarium berupa selapis epitel kuboidal (*simple cuboidal epithelium*). (Mohan, 2010; Johnson, 2011)
- Korteks Ovarium merupakan struktur yang aktif selama usia reproduktif, Selain itu korteks juga merupakan komponen yang luas dan dominan pada ovarium. Korteks ovarium mengandung folikel-folikel ovarium dan berbagai stadium perkembangannya. Di korteks ovarium dapat dijumpai folikel dalam berbagai tahap perkembangan yaitu sebagai berikut. (Johnson, 2011)

Tabel 3: Jenis-Jenis Folikel di Ovarium

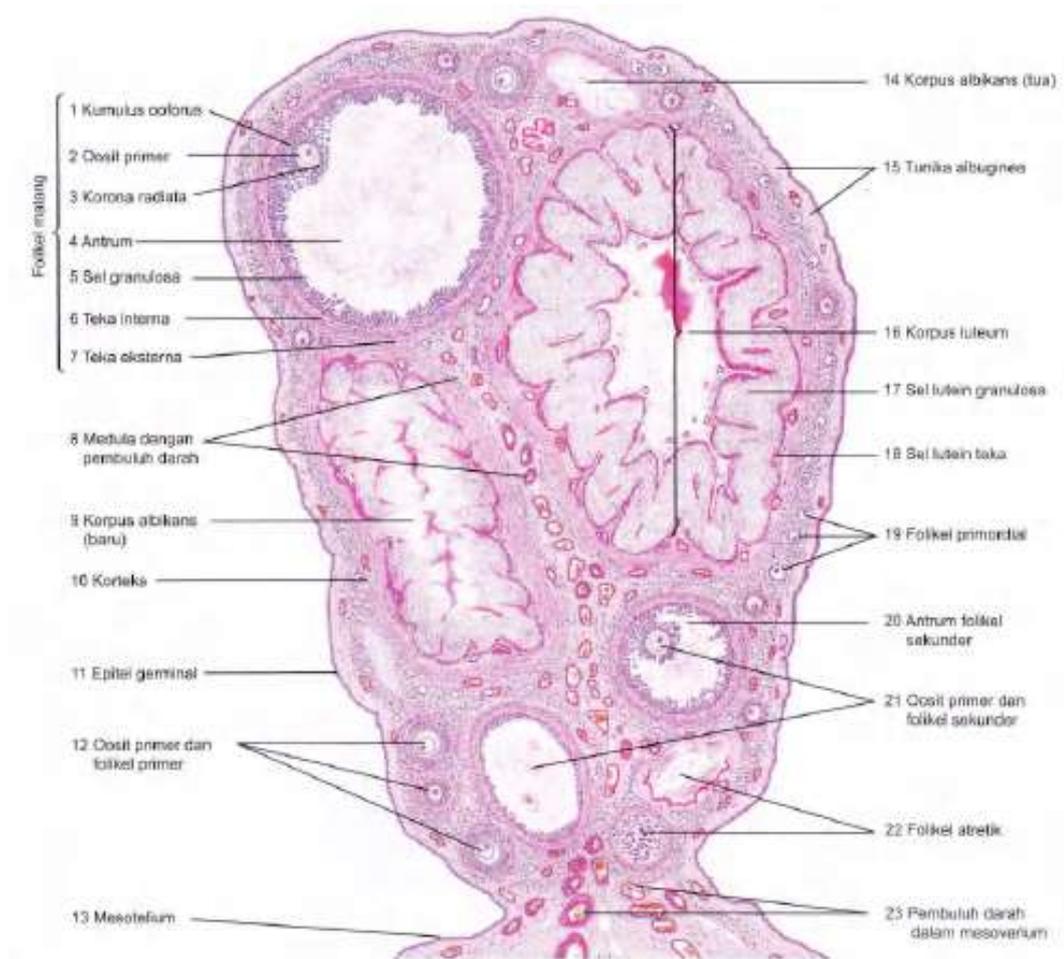
Folikel	Keterangan
<i>Folikel Primordial</i>	Folikel ini berisi <i>immature ovum</i> yang dikelilingi oleh selapis sel folikular pipih yang berbatasan dengan membrane basalis.
<i>Folikel Primer</i>	Folikel ini terdiri atas banyak lapisan dari epitel folikel yang disebut sel-sel granulosa (<i>stratum granulosum</i>). Karena terus menerus berkembang, oosit akan membentuk membrane yang refraktil yang disebut zona pelusida. Lebih lanjut, <i>gonadal stroma</i> juga mengalami diferensiasi membentuk suatu kapsul (<i>theca folliculi</i>) dan dipisahkan membrane basalis dengan struktur <i>stratum granulosum</i> .
<i>Folikel sekunder</i>	Folikel ini memiliki ciri khusus berupa struktur antrum yang berisi <i>liquor folliculi</i> . Struktur ini akan mencapai ukuran maksimalnya dan tidak akan mengalami pertumbuhan lebih lanjut. <i>Stratum granulosum</i> akan melapisi bagian dalam antrum dan disebut sebagai <i>cumulus oophorus</i> , sedangkan struktur yang mengelilingi oosit dan tertanam pada zona pelusida disebut <i>corona radiata</i> .
<i>Folikel de graff</i>	Folikel ovarium yang paling besar memiliki struktur yang mirip dengan folikel sekunder. Namun <i>corona radiata</i> pada folikel ini terlihat lebih jelas dan memiliki struktur antrum yang lebih besar.
<i>Corpus luteum</i>	Massa epitel kelenkar yang kolaps dan berlipat, terdiri dari sel lutein teka (<i>teka interna</i>) dan sel granulosa. Sel lutein teka meluas disepanjang septum jaringan ikat ke dalam lipatan korpus luteum.
<i>Corpus albicans</i>	<i>Corpus luteum</i> yang tidak dibuahi akan mengalami regresi, degenerasi, dan akan menjadi jaringan parut yang disebut <i>corpus albicans</i> .

Sumber: (Johnson, 2011; Eroschenko, 2015)

Masing-Masing folikel berisi *germ cell ovum* pada bagian tengah dan dikelilingi oleh *gonadal stroma*. *Gonadal stroma* terdiri dari sel-sel granulosa yang mengelilingi ovum dan sel teka berberbentuk *spindle* yang tersusun kosentrik. Komponen *granulosa* pada ovarium bersifat *avascular* sehingga nutrisi diperoleh dari komponen teka yang bersifat *vascular*. Sementara itu, komponen teka memiliki 2 bagian yaitu *luteinized theca layer* yang disebut sebagai teka interna, dan bagian stroma yang lebih luar dengan densitas yang lebih padat disebut teka eksterna. Komponen granulosa dan teka interna berkerjasama dalam sekresi hormon esterogen. Setelah folikel ovarium matur, maka folikel akan mengalami ovulasi dan folikel

yang telah melepaskan ovum disebut sebagai corpus luteum yang menjadi sumber utama hormone progesterone (fase sekretorik pada endometrium). (Krause, 2005; Mohan, 2010)

c. Medulla ovarium merupakan bagian ovarium yang disusun oleh serat jaringan ikat, sel-sel otot polos, pembuluh darah, jaringan limfatik, dan saraf. Medulla juga mengandung rete ovarii. Rete ovarii merupakan jala-jala anastomosis ductus tertutup yang dibatasi oleh epitel kuboidal rendah. Rete ovarii adalah struktur yang homolog dengan rete testis pada pria, yang mungkin juga memiliki peran androgenik yang kontras dengan peran estrogenik pada korteks ovarium. (Mohan, 2010; Johnson, 2011)

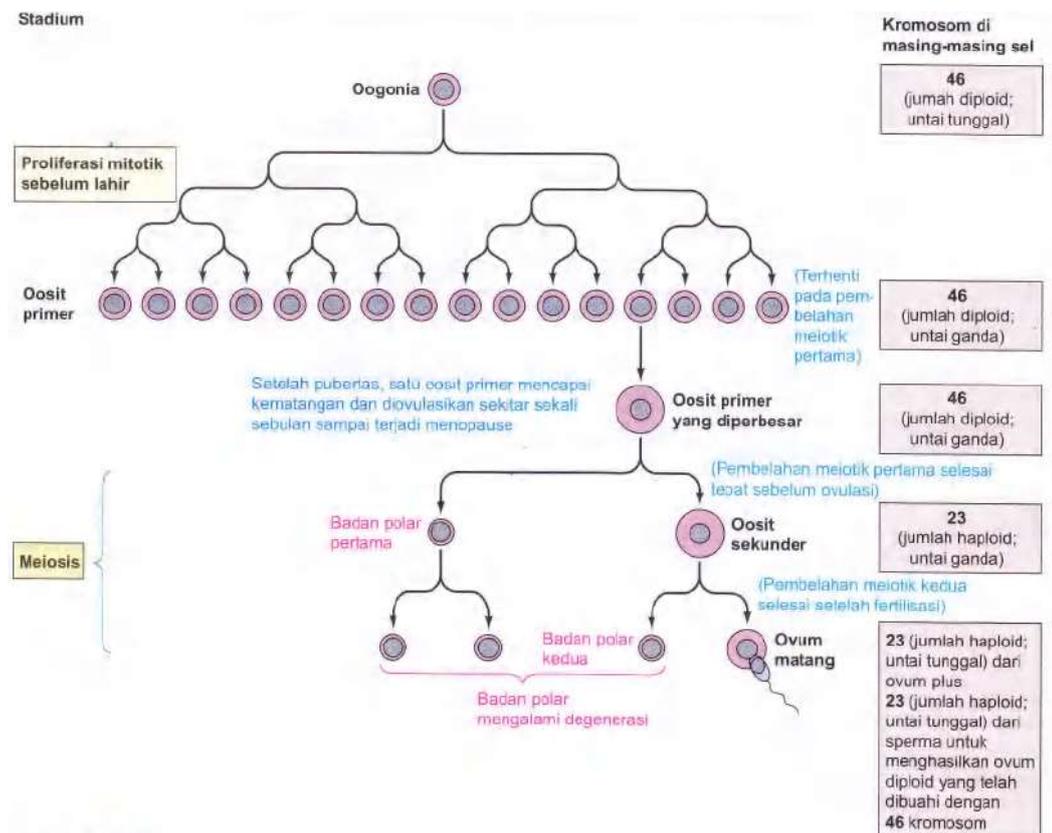


Gambar 4: Gambaran Mikroskopis Ovarium (Perbesaran Sedang). Pewarnaan: HE

5.3. Fisiologi Ovarium

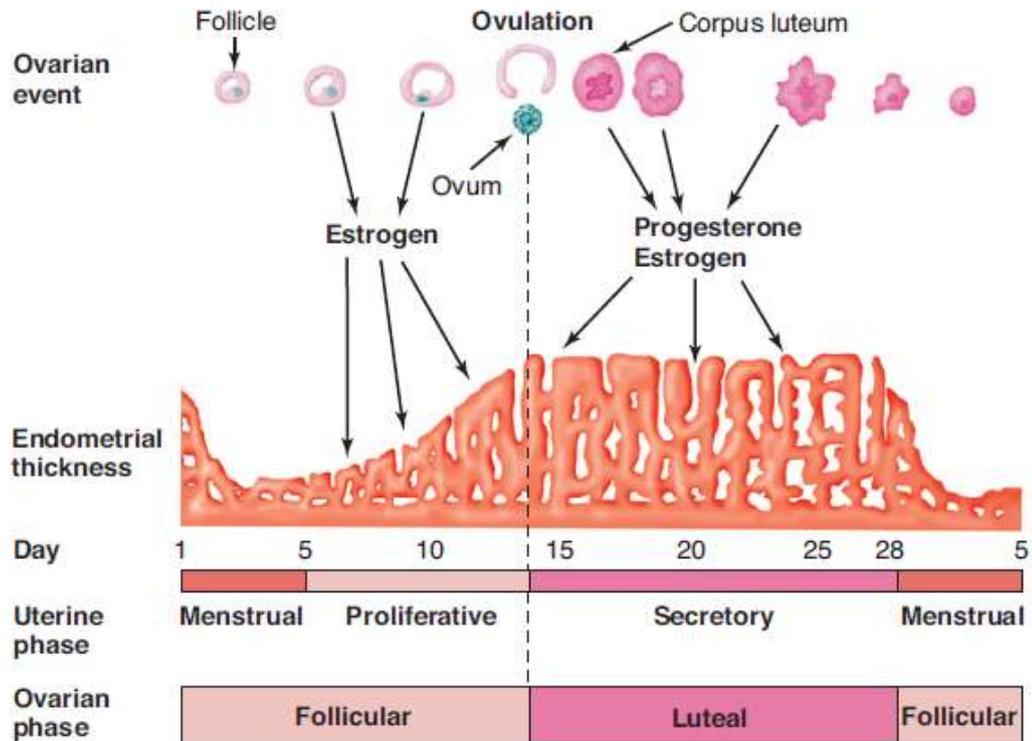
Ovarium melakukan fungsi ganda dan berhubungan satu sama lain berupa oogenesis (menghasilkan ovum) dan sekresi estrogen dan progesteron. Terdapat dua unit endokrin

ovarium yang secara berurutan melaksanakan fungsi-fungsi tersebut: folikel dan korpus luteum.



Gambar 5: Gambaran proses Oogenesis (Sherwood, 2013)

Oogenesis merupakan suatu proses yang Langkah-langkah homolog dengan replikasi dan pembelahan pada spermatogenesis, akan tetapi waktu dan hasil akhir sangat berbeda. Spermatogenesis selesai dalam waktu dua bulan, sementara tahap-tahap serupa dalam oogenesis terjadi dalam waktu antara usia 12 sampai 50 tahun secara siklik, dari awal pubertas hingga menopause. Seorang wanita lahir dengan jumlah sel germinativum yang terbatas dan umumnya tidak dapat diperbarui, sementara pria pascapubertas dapat menghasilkan ratusan juta sperma setiap hari. Setiap oosit primer hanya menghasilkan satu ovum kaya sitoplasma disertai tiga badan polar hampir tanpa sitoplasma yang kemudian berdisintegrasi, sementara setiap spermatosit primer menghasilkan empat spermatozoa yang memiliki kemampuan hidup sama.

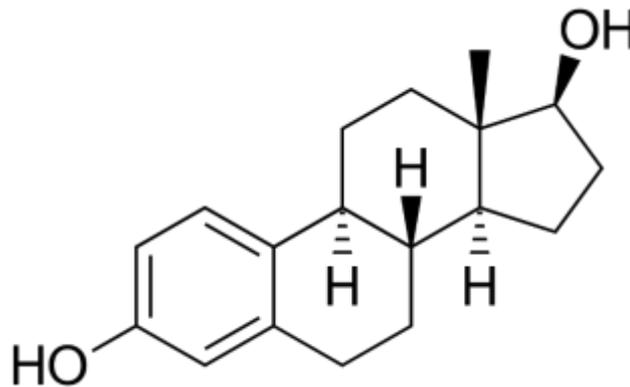


Gambar 6: Siklus Menstruasi (Barrett *et al.*, 2012)

Oogenesis dan sekresi estrogen berlangsung di dalam suatu folikel ovarium selama paruh pertama setiap siklus reproduksi (fase folikular) di bawah pengaruh FSH, LH, dan estrogen. Pada sekitar pertengahan siklus, folikel yang matang melepaskan sebuah ovum (ovulasi). Ovulasi dipicu oleh lonjakan LH yang ditimbulkan oleh estrogen kadar tinggi yang dihasilkan oleh folikel matang. Di bawah pengaruh LH, folikel yang telah kosong kemudian diubah menjadi korpus luteum, yang menghasilkan progesteron serta estrogen selama paruh terakhir siklus (fase luteal). Unit endokrin ini mempersiapkan uterus untuk implantasi seandainya ovum yang dibebaskan dibuahi. Jika fertilisasi dan implantasi tidak terjadi maka korpus luteum berdegenerasi. Hilangnya dukungan hormon untuk lapisan dalam endometrium yang telah berkembang penuh ini menyebabkan lapisan tersebut berdisintegrasi dan terlepas, menghasilkan darah haid. Secara bersamaan, fase folikular baru kembali dimulai.

6. Esterogen

Esterogen merupakan kelompok hormone yang disintesis pada berbagai organ. 17β -Estradiol merupakan hormon primer yang berasal dari Ovarium. Jalur umum dan lokalisasi subseluler enzim-enzim yang berperan dalam tahap awal sintesis estradiol sama dengan jalur lokalisasi enzim yang terlibat dalam biosintesis androgen.



Gambar 7: Struktur Esterogen

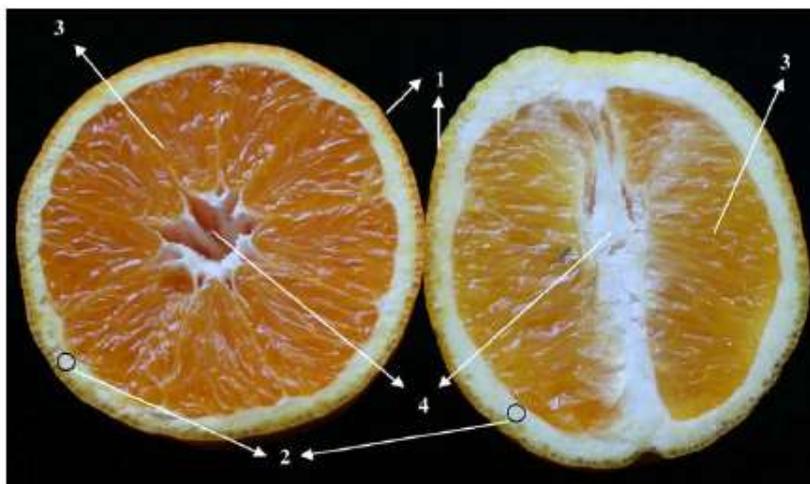
Sintesis esterogen dapat dilakukan melalui sintesis esterogen glandular maupun extraglandular.

- a. Sintesis glandular terjadi didalam sel-sel teka dan granulosa di ovarium. Sel-sel granulosa akan distimulasi oleh LH untuk memproduksi pregnenolone. Pregnenolone kemudian berdifusi keluar untuk masuk kedalam sel-sel teka sekitarnya. Didalam sel-sel teka mengekspresikan enzim 17,20-lyase dan 3β -HSD, dimana enzim-enzim ini akan memediasi konversi pregnolone menjadi DHEA kemudian menjadi androstenedione. Mayoritas androstenedione Kembali ke sel-sel granulosa dan dikonversi menjadi estrone oleh aromatase. Estrone ini akan dikonversi menjadi estradiol oleh 17β -HSD. Ekspresi dari enzim ini dikontrol oleh Stimulasi FSH.

- b. Sintesis esterogen ektraglandular terjadi di luar dari organ genital dan difasilitasi oleh proses aromatisasi dari androgen menjadi estrone. Terdapat dua organ yang cenderung menghasilkan androgen yaitu tulang dan lemak. Pada jaringan perifer 80% estradiol disintesis di perifer melalui proses aromatisasi testosterone menjadi estradiol. Nmaun pada wanita 50% dari androgen sebagai substrat dari proses aromatisasi dihasilkan oleh kelenjar adrenal yang akan digunakan saat masa kehamilan dan pasca menopause.

7. Jeruk Sunkist

Tanaman *Citrus* merupakan kelompok tanaman yang berasal dari family Rutaceae (Rafiq et al., 2016). Genus *Citrus* (*Citrus* L. dari *Rutaceae*) adalah salah satu tanaman buah dunia yang paling umum dan dikonsumsi sebagian besar sebagai produk segar atau jus karena nilai gizi dan rasanya yang khas. Yang paling populer di Eropa dan Amerika Utara adalah grapefruits (*Citrus paradisi*), lemon (*Citrus limon*), limau (*Citrus aurantiifolia*) dan jeruk manis (*Citrus sinensis*). Tingkat konsumsi buah jeruk atau jusnya ditemukan berbanding terbalik dengan kejadian beberapa penyakit. Manfaat kesehatan buah jeruk terutama dikaitkan dengan keberadaan senyawa bioaktif, seperti fenolat (misalnya, glikosida flavanon, asam hidroksininnamik), vitamin C, dan karotenoid. Meskipun, buah-buahan tersebut terutama digunakan untuk pencuci mulut, buah-buahan tersebut juga sumber minyak esensial karena keberadaan senyawa aromatnya. Sebagai contoh, rasa jeruk nipis digunakan dalam minuman, penganan, kue dan makanan penutup. Banyak penulis telah melaporkan sifat antioksidan dan radikal minyak esensial dan dalam beberapa kasus, aplikasi yang langsung berhubungan dengan makanan (Guimarães et al., 2010).



Gambar 8: Bagian-Bagian *Citrus sinensis*. 1-Flavedo (Permukaan perifer dari kulit jeruk atau epicarp); 2-Albedo (lapisan medial serabut halus putih dari kulit jeruk atau mesocarp); 3-Lapisan

dalam dari buah atau endocarp, dibagi dalam beberapa segement atau *carpels* dengan vesikel berisi jus; 4-Kolum sentral atau medulla. Sumber: (Guimarães *et al.*, 2010)

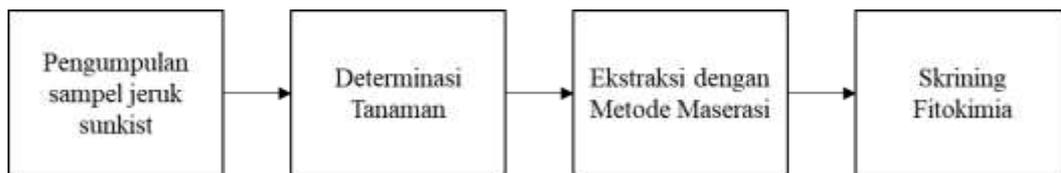
Tanaman Citrus menjanjikan berbagai manfaat nutrisi maupun kehidupan manusia. Pengolahan produk samping Citrus berpotensi mewakili sumber yang kaya senyawa fenolik dan serat makanan, karena banyak dijumpai pada kulit. Residu buah jeruk ini, yang umumnya dibuang sebagai limbah di lingkungan, dapat bertindak sebagai sumber daya nutraceutical yang potensial. Karena biayanya yang murah dan mudah ketersediaannya, limbah tersebut mampu menawarkan suplemen makanan bergizi rendah yang signifikan. Pemanfaatan residu sitrus kaya bioaktif ini dapat memberikan platform yang efisien, murah, dan ramah lingkungan untuk produksi nutraceuticals baru atau untuk peningkatan yang telah ada (Rafiq *et al.*, 2016).

Banyak penelitian yang telah dilakukan pada kulit jeruk terutama jeruk manis (*Citrus sinensis*) guna meneliti efeknya bagi kesehatan diantaranya antioksidan, antibakteri, dan antiinflamasi yang komperabel dengan asam ascorbat, siprofloksasi, dan aspirin secara berturut-turut. Hal ini bisa saja berkaitan dengan kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, dan steroid pada ekstra kulit jeruk manis (Omodamiro and Umekwe, 2013).

8. Karakteristik Sampel Jeruk Sunkist

8.1. Kerangka Konsep

Gambar di bawah ini merujuk pada kerangka konsep dalam menggambarkan karakteristik sampel yang akan digunakan dalam investigasi manfaat dari kulit jeruk Sunkist.



Gambar 9: Kerangka Konsep

Gambar di atas menunjukkan bahwa karakteristik sampel meliputi taksonomi sampel yang dilakukan oleh Herbarium Medanese Universitas Sumatera Utara melalui determinasi tanaman, kemudian sampel tersebut di ekstrak dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Kemudian di analisa kandungan fitomia sampel meliputi: fenol, steroid/ triterpenoid, terpenoid, saponin, flavonoid, tannin dan alkaloid.

8.2. Cara Kerja

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan mengumpulkan sampel jeruk sunkist dari salah satu pasar tradisional di Kota Medan, yang kemudian diidentifikasi di Herbarium Medanese di FMIPA Universitas Sumatera Utara.

Sejumlah 500 gram simplisia segar kulit jeruk sunkist dikeringkan dengan diangin-anginkan selama 7 hari sampai menjadi simplisia kering, yang kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia kering. Serbuk simplisia kering tersebut diekstraksi dengan metode remaserasi, yaitu sejumlah serbuk simplisia kering dimaserasi terlebih dahulu menggunakan metanol sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 selama 3 hari, campuran diaduk secara rutin setiap hari. Setelah 5 hari, campuran tersebut disaring dengan kertas saring, kemudian residu

diremaserasi ulang dengan 600 ml etanol 70% selama 4 hari. Kemudian hasil remaserasi disaring dan filtrate dari hasil maserasi dan remaserasi dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C dan selanjutnya dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga menjadi ekstrak kental (Kosasih *et al.*, 2019; Mutia and Chiuman, 2019).

Skrining fitokimia dilakukan dengan modifikasi cara Fansworth yang terdiri dari identifikasi fenol, steroid/ triterpenoid, terpenoid, saponin, flavonoid, tannin dan alkaloid (Widowati *et al.*, 2016, 2017, 2018).

a. Identifikasi Fenol

Pengujian dilakukan di plate tetes, ekstrak metanol bunga mawar ditambahkan FeCl_3 (1% dalam air/ethanol), bila terjadi perubahan warna hijau/merah/ungu/biru/ hitam menunjukkan adanya kandungan fenol.

b. Identifikasi Steroid/ Triterpenoid

Ekstrak metanol kulit bunga mawar disimpan pada plate tetes, kemudian ditambah asam asetat anhidrat sampai terendam, dibiarkan selama 10-15 menit, kemudian ditambahkan 1 tetes asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Apabila terjadi perubahan warna hijau/biru menunjukkan adanya kandungan steroid, adanya endapan merah/jingga menunjukkan adanya kandungan triterpenoid.

c. Identifikasi Saponin

Ekstrak metanol bunga mawar dilarutkan dalam aquadest dan kocok kuat-kuat, kemudian amati yang terjadi, kandungan saponin diindikasikan dengan terbentuknya busa stabil diatas larutan.

d. Identifikasi Tanin

Ekstrak metanol bunga mawar direndam dalam tabung reaksi dengan larutan HCl 2N kemudian panaskan diatas penangas air selama 30 menit dan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya jingga/ merah pada lapisan amil alcohol (lapisan atas).

e. Identifikasi Terpenoid

Ekstrak metanol bunga mawar ditempatkan pada plate tetes selanjutnya ditambahkan vanillin dan larutan H_2SO_4 , reaksi positif ditandai dengan adanya perubahan warna yang terjadi menjadi warna ungu.

f. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak metanol bunga mawar dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi butiran Mg/Zn dan selanjutnya ditambahkan larutan HCl 2N, kemudian inkubasi selama 5-10 menit dan tambahkan larutan amil alcohol pada filtrat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga.

g. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak metanol bunga mawar ditambahkan larutan ammonia 10%, selanjutnya ekstraksi dengan kloroform dan terbentuk 2 lapisan, lapisan bawah dipindahkan pada tabung reaksi baru dan ditambahkan HCl 2N kemudian lapisan asam (lapisan atas) dipindahkan kembali pada tabung reaksi baru dan ditambahkan larutan dragendrof. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan kuning sampai merah bata.

8.3. Hasil Penelitian

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan pada sampel yang digunakan menunjukkan taksonomi dari jeruk Sunkist yang digunakan adalah:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneane
Ordo	: Rustales
Family	: Rutaceae

Genus : Citrus

Species : *Citrus sinensis* L. Osbeck

Nama Lokal : Jeruk Sunkist

Kemudian ekstrak kulit jeruk Sunkist yang didapat dilakukan skrining fitokimia dan hasil skrining adalah sebagai berikut:

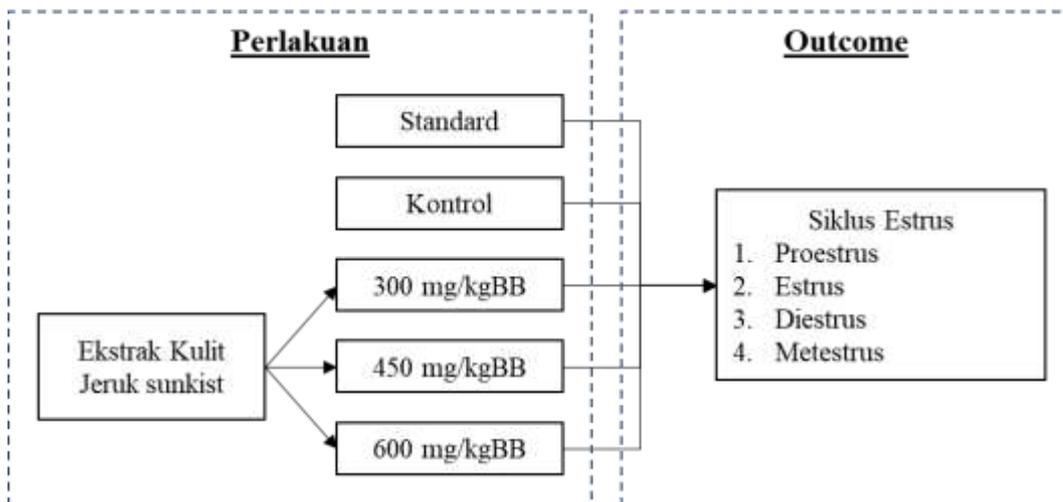
Tabel 4: Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist

No.	Metabolit Sekunder	Hasil
1.	Flavonoid	+
2.	Tanin	+
3.	Saponin	+
4.	Steroid	-
5.	Terpenoid	+
6.	Glikosida	+
7.	Alkaloid	+

9. Peran Fitoestrogen pada Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist terhadap Siklus Estrus Tikus Wistar

9.1. Kerangka Konsep

Gambar berikut ini menunjukkan kerangka konsep dari evaluasi manfaat fitoestrogen pada kulit jeruk Sunkist terhadap siklus estrus tikus wistar betina.



Gambar 10: Kerangka Konsep

Gambar kerangka konsep di atas menunjukkan bahwa evaluasi dari manfaat kulit jeruk Sunkist dievaluasi dari ekstrak etanol yang sebelumnya telah di karakterisasi. Ekstrak tersebut kemudian di kelompokkan dalam 3 dosis berbeda yaitu 300 mg/kgBB, 450 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB dan dibandingkan dengan kelompok standar dan control. Outcome/ Hasil yang dievaluasi adalah panjang masing-masing fase pada siklus estrus.

9.2. Cara Kerja

9.2.1. Pembuatan suspensi oral

Evaluasi dari peran fitoestrogen pada kulit jeruk Sunkist terhadap siklus estrus tikus wistar betina dilakukan dengan persiapan suspense oral dari ekstrak kulit jeruk Sunkist dan standar.

a. Pembuatan Suspensi Na-CMC 0.5%

Sebanyak 0.5 gram Na-CMC dicampur dengan sekitar 30 ml aquades panas didalam lumpang, campuran ini didiamkan selama 15 menit hingga membentuk campuran yang transparan. Kemudian campuran tersebut digerus hingga homogen dan diencerkan dengan air suling menggunakan labu ukur 100 ml sampai tanda batas.

b. Pembuatan Suspensi Oral Ekstrak etanol kulit jeruk sunkist

Pembuatan suspensi oral ekstrak etanol kulit jeruk sunkist dengan mencampurkan 300 mg, 600 mg, dan 1200 mg ekstrak etanol kulit jeruk sunkist untuk membuat suspensi oral dengan dosis 300 mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB secara berturut-turut dengan suspensi Na-CMC 0.5% menggunakan labu ukur 5 ml sampai tanda batas.

c. Pembuatan Suspensi Oral Standard Etinil Estradiol

Pembuatan suspensi oral ini sama dengan pembuatan suspensi oral ekstrak, yaitu dengan mencampurkan 50 µg etinil estradiol yang telah digerus kedalam suspensi Na-CMC 0.5% menggunakan labu ukur 5 ml sampai tanda batas.

9.2.2. Perlakuan pada Hewan Coba

Perlakuan dilakukan pada 25 ekor tikus yang dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan dan seluruh tikus diinduksi dengan aloksan, sebagai berikut:

Tabel 5: Kelompok Perlakuan Tikus

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kontrol	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi Na-CMC 0.5%. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Standar (Etinil estradiol 50 µg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral etinil estradiol (Lynoral®) Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Jeruk sunkist (300 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 300 mg/kgBB. Makan

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
	dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Jeruk sunkist (600 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 600 mg/kgBB. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Salak Dosis (1200 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 1200 mg/kgBB. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum

9.2.3. Pengambilan Apusan Vagina

Pembuatan preparat ulas vagina dilakukan setiap 8-12 jam. Pembuatan preparat ulas vagina menggunakan cotton bud yang telah direndam dalam NaCl fisiologis 0.9% sesaat sebelum digunakan, kemudian diulaskan pada dinding vagina dengan diputar 360°. Hasil ulasan dioleskan pada gelas objek, setelah hasil ulasanya kering kemudian difiksasi dengan methanol selama 5 menit dan diwarnai dengan giemsa 10% selama 30 menit. Preparat tersebut selanjutnya dicuci dengan air mengalir perlahan dan dikering anginkan. (Byers *et al.*, 2012; Cora, Kooistra and Travlos, 2015).

9.2.4. Pewarnaan Giemsa pada Apusan Vagina

Apusan vagina yang sudah diambil diletakkan di object glass kemudian diwarnai dengan pewarna giemsa yang sudah di encerkan. Pengenceran dilakukan dengan mencampurkan pewarna giemsa dengan buffer giemsa dengan perbandingan 1:9. Pewarnaan tersebut dilakukan selama 30 menit, lalu dibilas dengan air mengalir dan ditunggu hingga kering. Kelebihan air diserap dengan tisu.

Siklus estrus ditentukan dengan mengamati preparat ulas vagina dibawah mikroskop dengan pembesaran 10x10 dan 40x10. Penentuan fase siklus estrus dari hasil ulas vagina dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel-sel epitel vagina dan jumlahnya. (Byers *et al.*, 2012; Cora, Kooistra and Travlos, 2015).

9.2.5. Evaluasi Apusan Vagina

Evaluasi apusan vagina didasarkan pada keberadaan dari leukosit (neutrophil), sel epitel, *cornified epithelial cell*, dan densitas dari sel-sel tersebut. Interpretasi dari masing-masing komponen tersebut adalah sebagai berikut (Byers et al., 2012; Cora, Kooistra and Travlos, 2015).

Tabel 6: Interpretasi Gambaran Apusan Vagina Tikus Wistar Betina

Fase	Neutrofil	Sel Epitel Kecil Berinti	Sel Epitel Besar Berinti	Sel epitel tanpa nukleus terkeratinisasi	Densitas Relatif
Proestrus	0 sampai +	++ sampai +++	0 sampai +	0 sampai +	Redah – sedang
Estrus	0 sampai +	0 sampai ++	0 sampai ++	++ sampai +++	Sedang-tinggi
Metestrus	+ sampai +++	+ sampai ++	+ sampai ++	+ sampai +++	Sedang – tinggi
Diestrus	++ sampai +++	+ sampai ++	+ sampai ++	0 sampai +	Rendah – sedang

9.3. Hasil Penelitian

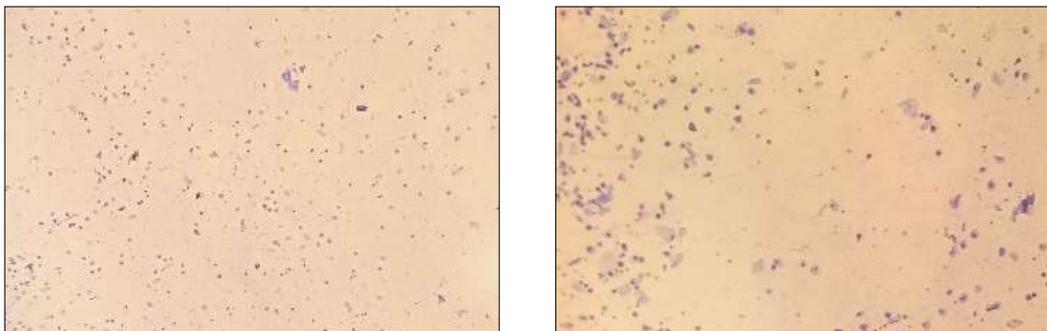
Dari hasil pelaksanaan penelitian ini didapati hasil berupa apusan vagina pada tikus selama 14 hari perlakuan sebagai berikut.

Tabel 7: Panjang Total dan Masing-Masing Siklus Estrus pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan

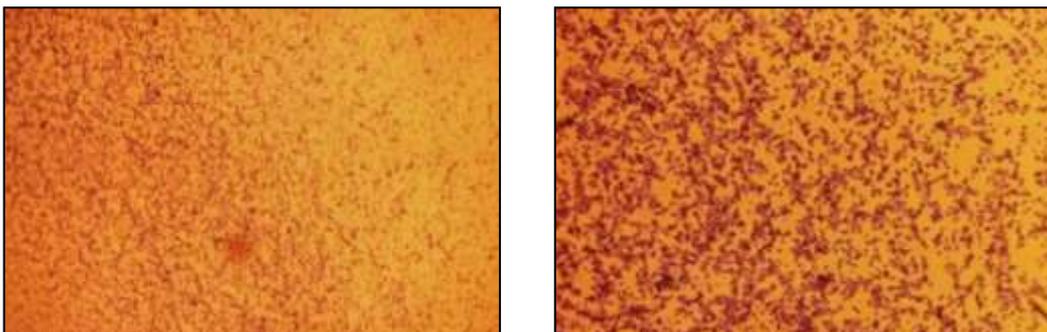
Kelompok	Siklus*				Panjang Total
	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus	Siklus**
Control	8.00 (1.00)	33.50 (12.00)	10.00 (1.00)	48.00 (24.00)	100.00 (25.00)
Standard	7.00 (0.00) ^a	56.00 (12.00) ^a	12.00 (0.00) ^a	16.00 (10.00) ^a	90.00 (18.00)
Ekstrak kulit Sunkist-I	8.00 (1.00) ^b	30.00 (12.00) ^b	10.00 (1.00) ^b	24.00 (24.00) ^{ab}	77.50 (36.00) ^a
Ekstrak kulit Sunkist -II	8.00 (1.00) ^b	36.00 (32.00) ^b	12.00 (2.00) ^a	24.00 (24.00) ^{ab}	91.00 (54.00)
Ekstrak kulit Sunkist -III	7.00 (0.00)	56.00 (12.00) ^a	12.00 (3.00) ^a	16.00 (6.00) ^a	91.50 (16.00)
Nilai P	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	0.001

* Nilai-P diperoleh dari Kruskal wallis dan Mann-Whitney; ** P-Value diperoleh dari one way ANOVA dan Post Hoc Test Games Howell; ^a Perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol; ^b Perbedaan yang signifikan terhadap kelompok standar

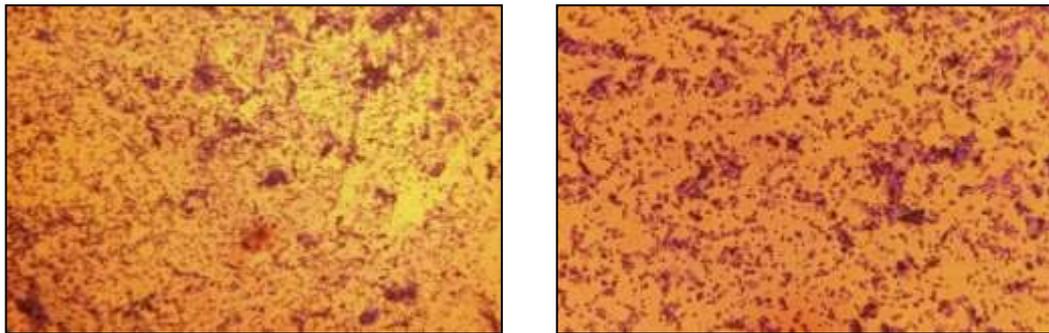
Berdasarkan tabel di atas, kelompok Standar dan ekstrak dosis tertinggi menunjukkan perpanjangan fase estrus dan metestrus yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan fase diestrus memendek secara signifikan. Sebaliknya, dua kelompok dosis lebih rendah menunjukkan perpanjangan fase estrus dan metestrus, tetapi tidak sepanjang pada kelompok standar. Mereka juga menunjukkan bahwa pemendekan dari fase diestrus, tetapi tidak sependek fase diestrus pada kelompok standar. Selain itu, lama siklus estrus dari masing-masing kelompok tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok kontrol, kecuali ekstrak kulit Sunkist dengan dosis yang lebih rendah. Tabel berikut menunjukkan tampilan mikroskopis usap vagina dari setiap kelompok sampel.



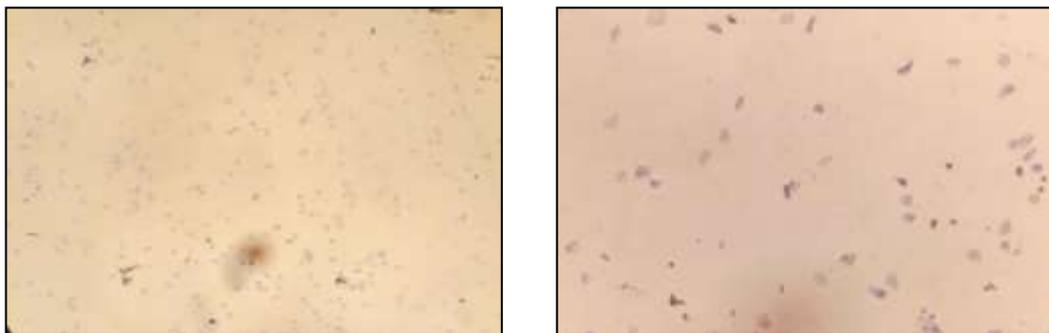
Gambar 11: Gambaran Apusan Vagina Proestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan)



Gambar 12: Gambaran Apusan Vagina Estrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan)



Gambar 13: Gambaran Apusan Vagina Metestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan)



Gambar 14: Gambaran Apusan Vagina Diestrus. Perbesaran 40x (Kiri) dan Perbesaran 100x (Kanan)

Tikus sebagai hewan pengerat memiliki siklus estrus yang mirip dengan siklus reproduksi manusia yang disebut siklus menstruasi (siklus ovarium dan uterus). Fase estrus meliputi proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus yang terjadi sekitar 4 sampai 5 hari. Tabel berikut menunjukkan panjang fase dalam siklus estrus.

Tabel 8: Panjang Fase-Fase pada Siklus Estrus

Fase	Panjang Siklus (Jam)
Proestrous	14
Estrus	24-48
Metestrus	6-8
Diestrus	48-72

Sumber: (Byers *et al.*, 2012)

Siklus estrus pertama tikus dimulai setelah pelepasan hormon Luteinizing (LH) secara pulsatil setelah minggu keempat pasca dilahirkan (sekitar 30 hari). Setelah kejadian ini, tikus sedang dalam masa pubertas. Selain itu, setelah pubertas pertama, tikus berada dalam fase anestrus selama 8 hingga 9 hari sebelum memasuki proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus pertama mereka. (Thakur *et al.*, 2009; Ngadju *et al.*, 2013)

Siklus estrus tikus menyerupai siklus menstruasi manusia. Fase proestrus tikus analog dengan tahap folikular manusia. Fase ini dipengaruhi oleh naiknya estradiol dan sedikit lonjakan prolaktin yang mengarah pada peningkatan LH dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Ketika FSH mencapai konsentrasi puncak, akan menyebabkan penurunan kadar estradiol secara cepat, dan terjadi ovulasi yang sesuai dengan fase estrus tikus. Setelah itu hormon progesteron menjadi dominan yang menimbulkan fase metestrus dan diestrus. Siklus ini analog dengan tahap awal dan akhir fase sekretorik pada manusia. (Thakur *et al.*, 2009; Cora, Kooistra and Travlos, 2015)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase estrus pada siklus estrus dari kelompok ekstrak dosis tertinggi mengalami perpanjangan. Besarnya siklus estrus dari kelompok ekstrak dosis tertinggi disebabkan oleh adanya fitoestrogen dalam ekstrak kulit Sunkist. Fitoestrogen memiliki struktur yang mirip dengan endogen estradiol dan berikatan dengan reseptor alfa dan beta estrogen. Selain itu, kompleks ini akan mempengaruhi ekspresi gen sel. Kuhnle dkk. (2009) melaporkan bahwa kulit jeruk mengandung 36 µg / 100g berat basah phytoestrogen berdasarkan LC-MS dan standar berlabel ¹³C. (Kuhnle *et al.*, 2009)

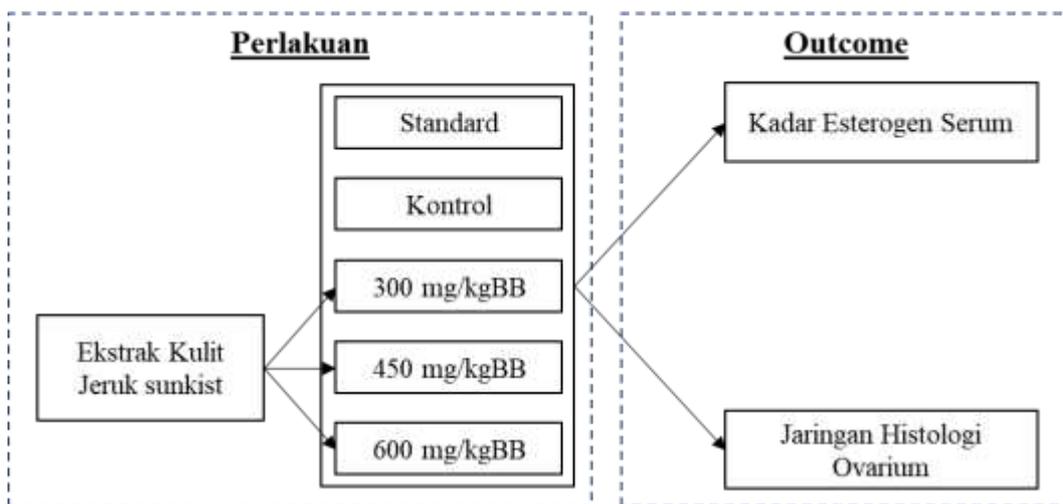
Selain itu, Shalaby *et al.* (2011) melaporkan bahwa keberadaan flavanon, flavon, dan flavonol dalam daun *Citrus sinensis* dan kulit *Citrus aurantifolia* menunjukkan aktivitas mirip estrogen yang kuat. Ketika fitoestrogen mempengaruhi ovarium, maka akan mempengaruhi pematangan oosit dan mengganggu siklus estrus.

Perpanjangan siklus menjadi penting karena dapat mengurangi jumlah siklus kumulatif dan menjadi sangat penting dalam siklus kesuburan. (Shalaby and Shanab, 2013; Maheshwari *et al.*, 2016; Desmawati and Sulastri, 2019) Secara keseluruhan, ekstrak sunkist dosis tertinggi dapat mencegah kemandulan dengan meningkatkan panjang periode siklus estrus (ovulasi) sebanding dengan kelompok standar.

10. Peran Fitoestrogen terhadap Esterogen Serum dan Jaringan Ovarium Tikus

10.1. Kerangka Konsep

Gambar berikut ini menunjukkan kerangka konsep dari evaluasi manfaat fitoestrogen pada kulit jeruk Sunkist terhadap kadar estrogen serum dan jaringan ovarium tikus wistar betina.



Gambar 15: Kerangka Konsep

Gambar kerangka konsep di atas menunjukkan bahwa evaluasi dari manfaat kulit jeruk Sunkist dievaluasi dari ekstrak etanol yang sebelumnya telah di karakterisasi. Ekstrak tersebut kemudian di kelompokkan dalam 3 dosis berbeda yaitu 300 mg/kgBB, 450 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB dan dibandingkan dengan kelompok standard dan control. Outcome/ Hasil yang dievaluasi adalah kadar esterogen serum dan histologi jaringan ovarium tikus wistar betina.

10.2. Cara Kerja



Gambar 16: Proses Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist

10.2.1. Pembuatan suspensi oral

Evaluasi dari peran fitoestrogen pada kulit jeruk Sunkist terhadap siklus estrus tikus wistar betina dilakukan dengan persiapan suspensi oral dari ekstrak kulit jeruk Sunkist dan standar.

a. Pembuatan Suspensi Na-CMC 0.5%

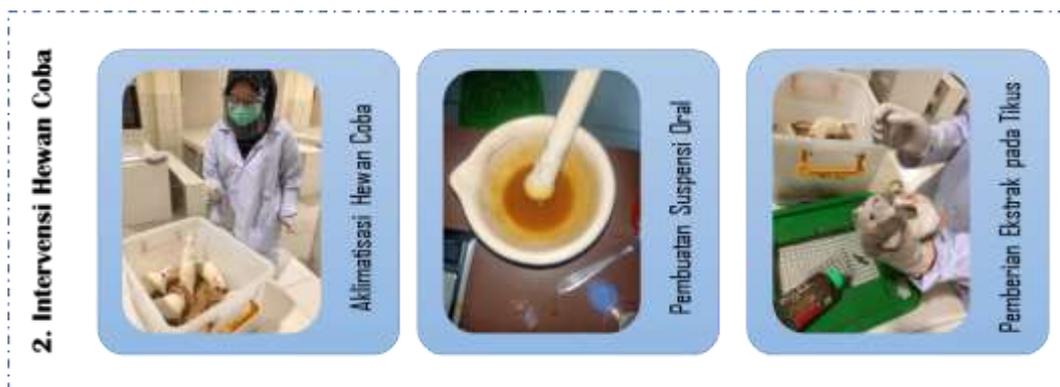
Sebanyak 0.5 gram Na-CMC dicampur dengan sekitar 30 ml aquades panas didalam lumpang, campuran ini didiamkan selama 15 menit hingga membentuk campuran yang transparan. Kemudian campuran tersebut digerus hingga homogen dan diencerkan dengan air suling menggunakan labu ukur 100 ml sampai tanda batas.

b. Pembuatan Suspensi Oral Ekstrak etanol kulit jeruk sunkist

Pembuatan suspensi oral ekstrak etanol kulit jeruk sunkist dengan mencampurkan 300 mg, 600 mg, dan 1200 mg ekstrak etanol kulit jeruk sunkist untuk membuat suspensi oral dengan dosis 300 mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB secara berturut-turut dengan suspensi Na-CMC 0.5% menggunakan labu ukur 5 ml sampai tanda batas.

c. Pembuatan Suspensi Oral Standard Etilin Estradiol

Pembuatan suspensi oral ini sama dengan pembuatan suspensi oral ekstrak, yaitu dengan mencampurkan 50 µg etinil estradiol yang telah digerus kedalam suspensi Na-CMC 0.5% menggunakan labu ukur 5 ml sampai tanda batas.



Gambar 17: Intervensi Hewan Coba

10.2.2. Perlakuan pada Hewan Coba

Perlakuan dilakukan pada 25 ekor tikus yang dikelompokkan ke dalam 5 kelompok perlakuan dan seluruh tikus diinduksi dengan aloksan, sebagai berikut:

Tabel 9: Kelompok Perlakuan Tikus

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Kontrol	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi Na-CMC 0.5%. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Standar (Etinil estradiol 50 $\mu\text{g}/\text{kgBB}$)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral etinil estradiol (Lynoral®) Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-I (300 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 300 mg/kgBB. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-II (600 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 600 mg/kgBB. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-III (1200 mg/kgBB)	Tikus pada kelompok ini menerima 1 ml suspensi oral ekstrak kulit jeruk sunkist dosis 1200 mg/kgBB. Makan dan Minum diberikan secara ad libitum



Gambar 18: Proses Pengambilan Jaringan dan Serum dari Hewan Coba

Setelah 15 hari, tikus tersebut dibius kemudian setelah terbius. Tikus kemudian dibedah untuk diambil darahnya secara intracardiac dengan spuit 5 cc dan needle 25G.

Dilanjutkan dengan mengambil ovarium. Organ tersebut kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0.9% untuk membersihkan dari sisa darah yang menempel. Pengamatan dilakukan dengan mengamati warna, tekstur permukaan, serta berat organ. Setelah ditimbang organ tersebut dibuat menjadi sediaan histologi dengan pewarnaan HE.

Organ-organ yang telah dicuci dengan NaCl 0,9% selanjutnya dimasukkan ke dalam pot yang berisi larutan buffer formalin 10%. Selanjutnya organ-organ tersebut dipotong dengan ketebalan 4 – 6 mm. Jaringan yang telah difiksasi kemudian didehidrasi dengan alkohol mulai dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% masing-masing selama 24 jam dilanjutkan dengan alkohol 100% selama 1 jam yang diulang tiga kali. Setelah didehidrasi dilanjutkan dengan penjernihan dengan menggunakan xilol sebanyak tiga kali masing-masing selama 1 jam dilanjutkan dengan infiltrasi parafin. Jaringan kemudian ditanam dalam media parafin. Berikutnya dilakukan penyayatan dengan ketebalan 4 - 5 mikron. Hasil sayatan dilekatkan pada kaca objek, kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoksin-eosin (HE).

Kadar estradiol ditentukan dari serum yang diperoleh dengan metode ELISA dan dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Medan. Sedangkan jaringan

ovarium diwarnai dengan HE Stain dan dievaluasi dengan mikroskop pada perbesaran 40x, 100x, dan 400x. Parameter jaringan ovarium yang dievaluasi adalah jumlah folikel primordial, primer, sekunder, de Graaf, korpus luteum, dan atresia sebagai persentase.

10.3. Hasil Penelitian

10.3.1. Estimasi Kadar Estradiol Serum

Kadar estradiol ditentukan dari serum tikus yang diperoleh dengan Metode ELISA. Setelah itu, kadar estradiol dianalisis dengan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan Post Hoc Test Tukey HSD. Tabel berikut ini menunjukkan hasil analisis pada kadar estradiol serum masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 10: Analisis Kadar Serum Estradiol pada Semua Kelompok Intervensi

Kelompok	Kadar Estradiol (pg/ml)	Nilai P
Kontrol	34.00 ± 1.58 ^a	< 0.05
Standar	53.60 ± 1.14 ^b	
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-I	43.80 ± 1.30 ^c	
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-II	46.20 ± 1.30 ^c	
Ekstrak Kulit Jeruk Sunkist-III	49.00 ± 1.58 ^d	

Data dinyatakan sebagai Mean ± SD dan P-Value diperoleh dengan One-Way ANOVA. Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama secara signifikan membedakan menurut Post-Hoc Test Tukey HSD.

Berdasarkan tabel di atas, semua kelompok intervensi menunjukkan perbedaan kadar estradiol yang signifikan satu sama lain. Hal itu ditunjukkan dengan nilai P dan superskrip yang diperoleh dengan uji ANOVA satu arah dan Post Hoc Tukey HSD.

10.3.2. Estimasi Perkembangan Folikel

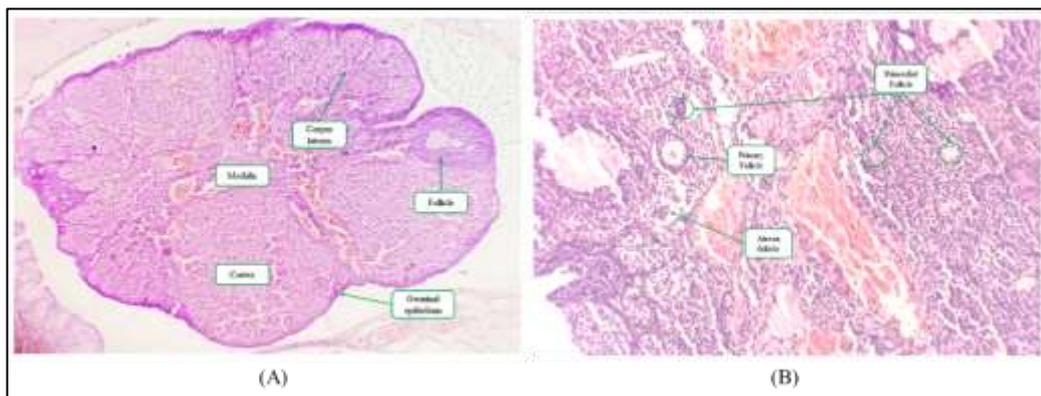
Selain kadar estradiol, penelitian ini juga meneliti jumlah folikel pada jaringan ovarium tikus. Jumlah folikel dinyatakan dalam persentase dan ditunjukkan oleh tabel di bawah ini.

Tabel 11: Analisis Persentase Folikel di Semua Kelompok Intervensi

Groups	Percentage of Follicle (%)					
	Primordial	Primer	Secondary	De Graff	Corpus Luteum	Atresia
Control	65.98 ± 0.55 ^a	27.82 ± 1.19 ^a	5.35 ± 1.55 ^a	0.75 (0.00-1.5) ^a	0.00 (0.00-0.50)	0.00 (0.00-0.00)
Standard	33.50 ± 0.80 ^b	35.28 ± 4.96 ^b	13.16 ± 5.25 ^b	5.30 (5.00-8.33) ^b	0.00 (0.00-0.50)	0.00 (0.00-0.25)
Sunkist Peels Extract-I	51.06 ± 0.75 ^c	37.75 ± 1.09 ^c	9.79 ± 1.68 ^c	1.00 (0.00-1.50) ^a	0.00 (0.00-1.25)	0.00 (0.00-0.25)
Sunkist Peels Extract-II	43.95 ± 1.11 ^d	34.39 ± 0.95 ^d	14.83 ± 2.70 ^d	3.50 (2.50-4.00) ^c	1.00 (0.00-1.50)	0.00 (0.00-0.25)
Sunkist Peels Extract-III	45.34 ± 0.79 ^e	34.18 ± 1.80 ^e	17.55 ± 1.03 ^{bd}	4.50 (3.40-5.00) ^d	1.00 (0.00-2.00)	0.50 (0.00-0.50)
P-Value	< 0.05*	< 0.05*	< 0.05*	< 0.05**	0.088**	0.157**

* Data dinyatakan sebagai Mean ± SD dan Nilai P diperoleh dari One-Way ANOVA dan dilanjutkan dengan Post Hoc Test Tukey HSD; ** Data dinyatakan sebagai Median (Min-Max) dan P-Value diperoleh dari Kruskal-Wallis dan diikuti oleh Mann-Whitney; Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama secara signifikan membedakan menurut uji post hoc Tukey HSD atau Mann-Whitney.

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa jumlah folikel primordial, primer, sekunder dan de graff secara statistic berbeda karena Nilai P lebih kecil dari 0,05. Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak kulit Sunkist menurunkan persentase folikel primordial dan primer tetapi meningkatkan persentase folikel sekunder dan folikel de Graff. Sisa folikel yaitu. korpus luteum dan atresia tidak menunjukkan perubahan persentase yang signifikan. Hal ini terlihat pada Nilai P yang lebih tinggi dari 0,05. Gambar di bawah ini menunjukkan histologi struktur ovarium.



Gambar 19: Gambaran Umum Ovarium Tikus: (A) Korteks dan Medula Ovarium (Perbesaran: 40x) dan (B) Korteks Ovarium (Perbesaran: 100x). Bagian Longitudinal. Stain: Pewarnaan HE

Berdasarkan gambar di atas, ovarium merupakan suatu struktur yang terdiri dari bagian korteks dan medula serta dilapisi oleh epitel germinal. Semua jenis folikel dapat ditemukan di korteks ovarium seperti folikel primordial, primer, dan atresia yang ditunjukkan pada gambar di atas. Selanjutnya struktur jelas tiap folikel dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

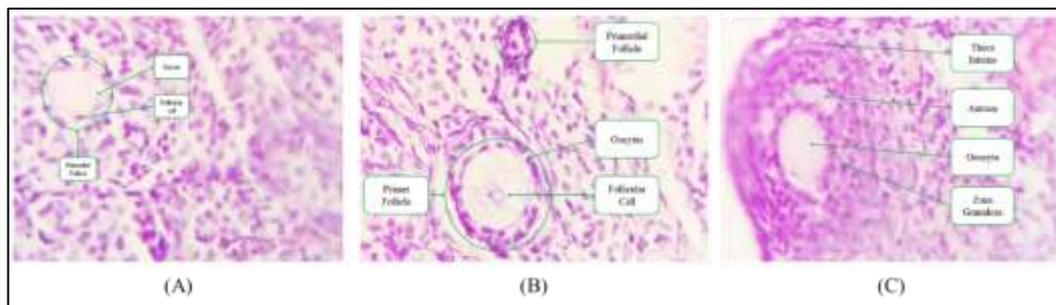
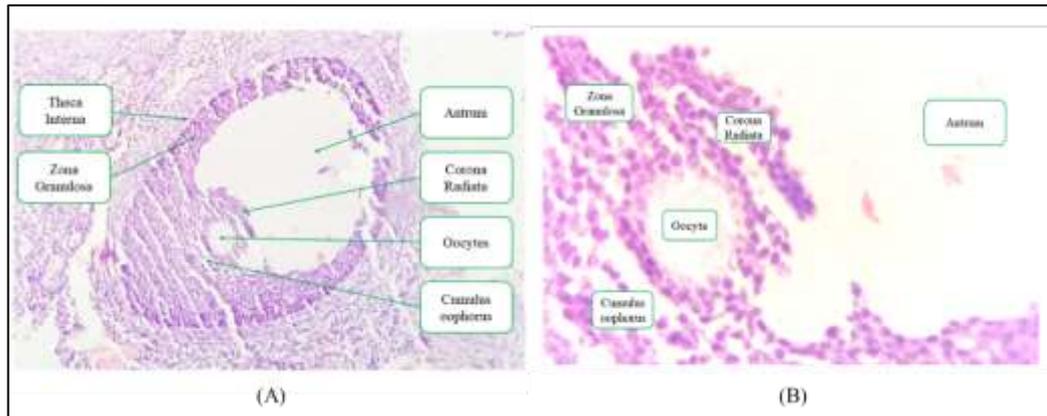


Figure 1: (A) Folikel Primordial, (B) Folikel Primer, dan (C) Folikel Sekunder dalam Korteks Ovarium Tikus. Perbesaran 400x. Bagian Longitudinal. Stain: Pewarnaan HE

Berdasarkan gambar di atas dapat dilihat struktur folikel primordial, primer, dan sekunder dengan perbesaran 400x. Folikel primer ditandai dengan oosit yang dilapisi oleh satu lapisan sel folikel skuamosa. Folikel primordial akan berkembang menjadi folikel primer. Lapisan tunggal sel folikel berubah bentuk menjadi kubus dan membentuk folikel primer. Seiring waktu, folikel primer berkembang menjadi folikel sekunder. Lapisan folikel berkembang membentuk struktur yang lebih bertingkat yang dikenal sebagai zona granulosa, dan folikel juga berkembang membentuk antrum di kutub folikel. Antrum akan melebar pada waktu yang tepat, korona radiata dan kumulus oofor di sekitar oosit menjadi lebih jelas. Karenanya folikel sekunder berkembang menjadi folikel de graff. Gambar di bawah ini berikut menunjukkan pandangan mikroskopis dari folikel de graff dalam dua perbesaran yang berbeda.



Gambar 20: Folikel de Graff: (A) Perbesaran 100 x diperbesar dan (B) Perbesaran 400x. Potongan Longitudinal. Stain: Pewarnaan HE

Gambar di atas menunjukkan bahwa folikel de graff memiliki struktur antrum yang lebih luas dan terlihat jelas kulumus oofor dan korona radiata sebagai sifat spesifik folikel de graff.

Ekstrak etanol Sunkist berpengaruh nyata terhadap kadar estradiol dan persentase folikel dalam ovarium. Peningkatan dosis ekstrak meningkatkan kadar estradiol serum, namun tidak sebaik obat standar. Selain itu, peningkatan dosis ekstrak menunjukkan peningkatan persentase folikel sekunder dan folikel de graff, tetapi menurunkan persentase folikel primordial dan primer.

Perkembangan folikel primordial dipengaruhi oleh FSH. Selain itu, hormon ini akan mempengaruhi maturasi folikel primordial menjadi hormon primer dan sekunder selama lapisan folikel yang berkembang lebih bertingkat yang akan meningkatkan kadar hormon estrogen. Hal ini karena sekresi hormon terjadi di sel folikel. Prekursor estrogen terbentuk di dalam sel teka; setelah itu, berdifusi ke dalam sel folikel dan diubah menjadi estradiol oleh 17β -HSD atau estrone oleh aromatase. FSH mengatur ekspresi enzim ini. (Sherwood, 2013; Hall, 2017; Sharaibi and Afolayan, 2017)

Peningkatan maturasi folikel dipengaruhi kadar estrogen. Kadar estrogen yang tinggi memiliki dua efek utama pada maturasi folikel. Pertama, memberikan umpan balik positif terhadap hipofisis hipotalamus untuk memperkuat sekresi hormon estrogen sementara sel granulosa mensekresi inhibin untuk mengurangi sekresi FSH.

Efek lainnya adalah induksi ovulasi; Namun, ovulasi juga membutuhkan lonjakan LH untuk menginduksi ovulasi. (Sherwood, 2013; Ugwah-Oguejiofor *et al.*, 2014; Hall, 2017)

Teori di atas mendukung hasil penelitian ini. Peningkatan kadar estradiol menyebabkan meningkatnya jumlah folikel sekunder dan folikel de graff. Namun, peningkatan kadar estradiol tidak diikuti oleh lonjakan LH; karenanya ovulasi tidak terjadi. Di sisi lain, persentase folikel primordial dan primer menurun; Hal ini disebabkan oleh semakin banyaknya folikel yang berkembang menjadi folikel yang semakin matang.

Belum ada penelitian yang menyelidiki efek kulit Sunkist terhadap kesuburan wanita dengan pendekatan *in vivo*. Namun demikian, penelitian *in vitro* telah dilakukan untuk mengetahui kadar fitoestrogen dari kulit Sunkist. Fitoestrogen memiliki struktur yang mirip dengan endogen estradiol dan berikatan dengan reseptor alfa dan beta estrogen. Selain itu, kompleks ini akan mempengaruhi ekspresi gen sel. Kuhnle dkk. (2009) melaporkan bahwa kulit jeruk mengandung 36 µg / 100g berat basah fitoestrogen berdasarkan LC-MS dan standar berlabel ¹³C. (Kuhnle *et al.*, 2009) Studi lain yang dilakukan oleh Shalaby *et al.* (2011) pada daun *Citrus sinensis* dan kulit *Citrus aurantifolia* melaporkan bahwa flavanon, flavon, dan flavonol dapat bertindak sebagai aktivitas mirip estrogen yang kuat. (Shalaby and Shanab, 2013; Maheshwari *et al.*, 2016; Desmawati and Sulastri, 2019)

11. Penutup

Adapun kesimpulan yang dapat diambil dari buku ini sesuai dengan tujuan penulisan buku ini yang menjawab rumusan masalah yang ada, yaitu sebagai berikut:

- a. Infertilitas merupakan masalah umum yang sering dijumpai saat ini, hal ini dapat dilihat dari laporan-laporan terbaru yang menyatakan prevalensi infertilitas adalah 9 hingga 18% pada populasi umum. Secara global sekitar 15% pasangan suami istri secara global mengalami infertilitas sekitar 48,5 juta pasangan.
- b. Terdapat beberapa faktor yang dapat menyebabkan terjadi infertilitas namun sekitar > 70% infertilitas berasal dari faktor perempuan. Infertilitas pada perempuan dapat disebabkan dari ovarium, tuba, uterus, hipotalamus, hipofisis, ataupun karena penyakit sistemik.
- c. Fitoestrogen yang merupakan senyawa di alam yang diperoleh dari tumbuhan dan memiliki struktur yang mirip dengan 17- β -Estradiol (E2) yang merupakan hormon seksual utama perempuan.
- d. Pada ekstrak etanol kulit Jeruk Sunkist (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mengandung kandungan fitokimia berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan terpenoids.
- e. Siklus estrous merupakan siklus reproduksi utama pada spesies betina dari vertebrata non-primata. Siklus tipikal pada mamalia dari siklus estrous meliputi: proestrus, estrus, metestrus, diestrus, dan anestrus. Pada tikus siklus estrous (proestrus-diestrus) akan berulang setiap 4 sampai 5 hari sekali kecuali jika terjadi intrupsi karena kehamilan, kadang menyerupai kehamilan, dan anestrus.
- f. Tanaman *Citrus* merupakan kelompok tanaman yang berasal dari family Rutaceae (Rafiq et al., 2016). Genus *Citrus* (*Citrus* L. dari *Rutaceae*) adalah salah

satu tanaman buah dunia yang paling umum dan dikonsumsi sebagian besar sebagai produk segar atau jus karena nilai gizi dan rasanya yang khas.

- g. Ekstrak kulit jeruk sunkist dapat meningkatkan secara signifikan meningkatkan kadar estradiol serum dan meningkatkan pertumbuhan folikel de graff yang dapat meningkatkan peluang pembuahan tikus betina.
- h. Ekstrak kulit jeruk Sunkist pada dosis tinggi (600 mg/ kgBB) secara signifikan mampu meningkatkan panjang siklus estrus (ovulasi) seperti pada kelompok standard (Etil estradiol).

12. Daftar Pustaka

- Agarwal, A. *et al.* (2015) 'A unique view on male infertility around the globe', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(37), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1.
- Barrett, K. E. *et al.* (2012) *Ganong's Review of Medical Physiology 24th Edition*. New York: Mc Graw Hill Medical.
- Bhattacharya, S. *et al.* (2010) 'Female Infertility', *BMJ Publishing Group Ltd*, 11(819), pp. 1–47.
- Byers, S. L. *et al.* (2012) 'Mouse estrous cycle identification tool and images', *PLoS ONE*, 7(4), p. e35538. doi: 10.1371/journal.pone.0035538.
- Cora, M. C., Kooistra, L. and Travlos, G. (2015) 'Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears', *Toxicologic Pathology*, 43(6), pp. 776–793. doi: 10.1177/0192623315570339.
- Desmawati, D. and Sulastri, D. (2019) 'Phytoestrogens and their health effect', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(3), pp. 495–499. doi: 10.3889/oamjms.2019.086.
- Eroschenko, V. P. (2015) *Atlas Histologi di Fiore dengan Korelasi Fungsional*. 12th edn. Jakarta: EGC.
- Ghadir, S., Ambartsumyan, G. and DeCherney, A. H. (2013) 'Infertility', in DeCherney, A. H. *et al.* (eds) *Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology*. New York: Mc Graw Hill Medical, pp. 1495–1512.
- Guimarães, R. *et al.* (2010) 'Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange', *Food and Chemical Toxicology*. doi: 10.1016/j.fct.2009.09.022.
- Hall, J. E. (2017) *Guyton and Hall: Textbook of Medical Physiology*. Thirteenth. London: Elsevier. doi: 10.4103/sni.sni_327_17.
- Hanson, B. *et al.* (2017) 'Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34, pp. 167–177. doi: 10.1007/s10815-016-0836-8.
- Hestiantoro, A. *et al.* (2013) *Konsensus Penanganan Infertilitas*. Jakarta: HIFERI, PERFITRI, IAUI, POGI.
- Hoffman *et al.* (2016) *Williams Gynecology Third Edition*. New York: Mc Graw Hill.

- Johnson, K. E. (2011) *Quick Review Histologi % Biologi Sel Disertai Contoh Kolerasi Klinik*. Edited by L. Saputra. Tangerang Selatan: Binarupa Aksara.
- Kosasih, E. *et al.* (2019) 'Hepatoprotective Effect of Citrus Sinensis Peel Extract Against Isoniazid and Rifampicin-induced Liver Injury in Wistar Rats', *Majalah Obat Tradisional*, 24(3), pp. 197–203. doi: 10.22146/mot.45762.
- Krause, W. J. (2005) *Krause's Essential Human Histology for Medical Student*. 3rd edn. Missouri: University of Missouri School of Medicine.
- Kuhnle, G. G. C. *et al.* (2009) 'Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and ¹³C-labelled standards', *Food Chemistry*, 116(2), pp. 542–554. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.002.
- Maheshwari, H. *et al.* (2016) 'The Role of Fennel Infusion on Estrous Cycle and Follicles Development of White Rats', *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 14(1), pp. 19–25.
- Mohan, H. (2010) *Textbook of Pathology Sixth Edition*. New Delhi: Jaypee.
- Mutia, M. S. and Chiuman, L. (2019) 'Hepatoprotective Effect of Citrus sinensis (L .) Osbeck Ethanol Extract in Paracetamol-Induced Rats Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Citrus sinensis L . Osbeck pada Tikus yang Diinduksi Parasetamol', *Majalah Kedokteran Bandung*, 51(4), pp. 189–193.
- Ngadjui, E. *et al.* (2013) 'Effects of Ficus asperifolia on normal rat estrus cyclicity', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(1), pp. 53–57. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60023-4.
- Oikeh, Oriakhi, E. I. and Omoregie, K. (2013) 'Proximate Analysis and Phytochemical Screening of Citrus sinensis Fruit Wastes', *The Bioscientist*, 1(2), pp. 164–170.
- Omodamiro, O. D. and Umekwe, C. J. (2013) 'Evaluation of anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant properties of ethanolic extracts of Citrus sinensis peel and leaves', *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(5), pp. 56–66.
- Paulsen, F. and Waschke, J. (2012) *Sobotta Jilid 2 Atlas Anatomi Manusia Organ-Organ Dalam*. 23rd edn. Jakarta: EGC.
- Place, J. M. (2016) 'Infertility as a Women's Health Issue', *Fertility and Sterility*, 106(3), pp. e110–e111. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.316.
- Rafiq, S. *et al.* (2016) 'Citrus peel as a source of functional ingredient: A review', *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. doi: 10.1016/j.jssas.2016.07.006.

- Rietjens, I. M. C. M., Lousse, J. and Beekmann, K. (2017) 'The potential health effects of dietary phytoestrogens', *British Journal of Pharmacology*, 174(11), pp. 1263–1280. doi: 10.1111/bph.13622.
- Sa'adah, N. and Purnomo, W. (2016) 'Karakteristik dan Perilaku Berisiko Pasangan Infertil di Klinik Fertilitas dan Bayi Tabung Tiara Cita Rumah Sakit Putri Surabaya', *Jurnal Biometrika dan Kependudukan*, 5(1), pp. 61–69. doi: 10.20473/jbk.v5i1.2016.61-69.
- Shalaby, E. a and Shanab, S. M. M. (2013) 'Antioxidant compounds , assays of determination and mode of action', *African Journal of Pharmacy and Phamacology*, 7(10), pp. 528–539. doi: 10.5897/AJPP2013.
- Sharaibi, O. J. and Afolayan, A. J. (2017) 'Biochemical and Hormonal Effects of Nymphaea lotus Aqueous Extract on Hyperprolactinemic Female Wistar Rats', *Asian Journal of Biochemistry*, 12(3), pp. 91–98. doi: 10.3923/ajb.2017.91.98.
- Sharma, S. *et al.* (2011) 'Female Infertility: An Overview', *IJPSR*, 2(1), pp. 1–12.
- Sherwood, L. (2013) *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem, Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Jakarta: EGC. doi: 9781111577438.
- Simon, A., Chang, W. Y. and Cherney, A. H. De (2013) 'Amenorrhea', in DeCherney, A. H. *et al.* (eds) *Current Diagnosis & Treatment Obstetrics & Gynecology*. 11th edn. New York: Mc Graw Hill Medical, pp. 1514–1535.
- Thakur, S. *et al.* (2009) 'Effect of Carum carvi and Curcuma longa on hormonal and reproductive parameter of female rats.', *International Journal of Phytomedicine*, 1, pp. 31–38. doi: 10.5138/ijpm.2009.0975.0185.05791.
- Ugwah-Oguejiofor, C. J. *et al.* (2014) 'Effect of aqueous extract of Ficus platyphylla on Female Wistar rats with estradiol valerate-induced polycystic ovarian syndrome', *International Journal of Phytomedicine*, 6(3), pp. 405–411.
- Widowati, W. *et al.* (2016) 'Antioxidant and Anti Aging Assays of *Oryza sativa* Extracts, Vanillin and Coumaric Acid', *Journal of Natural Remedies*. doi: 10.18311/jnr/2016/7220.
- Widowati, W. *et al.* (2017) 'Antioxidant and antiaging assays of Hibiscus sabdariffa extract and its compounds', *Natural Product Sciences*, 23(3), pp. 192–200. doi: 10.20307/nps.2017.23.3.192.
- Widowati, W. *et al.* (2018) 'Antioxidant and antiaging activities of Jasminum sambac extract, and its compounds', *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 7(3), pp. 270–285.

Biografis Penulis



dr. Maya Sari Mutia, MKM, M. Biomed, AIFO-K, sebagai dosen tetap di Fakultas Kedokteran Universitas Prima Indonesia di Medan. Lahir di Medan, 18 Juli 1983. Mendapatkan gelar dokter di Universitas Sumatera Utara pada tahun 2009. Lulus magister Kesehatan masyarakat dalam bidang Kesehatan Reproduksi di Institut kesehatan Helvetia pada tahun 2017 dan Magister Sains Biomedis dalam bidang Histologi di Universitas Prima Indonesia pada tahun 2019. Pada saat ini menjabat sebagai wakil dekan Bidang Akademik Fakultas Kedokteran Universitas Prima Indonesia sejak tahun 2018. Mendapatkan sertifikasi AIFO-K (Ahli Ilmu Faal Olahraga - Klinis) pada tahun 2019. Selain itu, penulis juga sedang menjalani Pendidikan doctoral pada bidang kedokteran dasar di Universitas Prima Indonesia.

ISBN 978-623-7911-14-2

