

**ESTROGENIC EFFECT TEST OF YELLOW PUMPKIN SEED
(*Cucurbita moschata*) EXTRACT TO THE UTERINE WEIGHT
IN OVARIECTOMIZED RATS**

Alfaina Wahyuni¹, Munifah Ashlihati²

¹Program Studi Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

²Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Email: alfaina.wahyuni@umy.ac.id

ABSTRACT

Background: Menopausal syndrome is a health problem that resulted in a declined quality of life. This happens because there are no hormonal activities, one of them is estrogen. Giving supplements containing phytoestrogens can reduce these symptoms, for example is the content of pumpkin seed extract which has not been widely used in society.

Objective: To determine the effect of Yellow Pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds extract to the uterine weight in ovariectomized rats.

Methods: This was an experimental in vivo study with Post Test Only Control Group Design. Subjects were 30 Sprague-Dawley female rats, aged 8 weeks, weight 148-280 grams. Treatments include normal control, negative control, positive control and intervention groups 1, 2 and 3 (extract 100, 200 and 400mg/kg). The data were collected using uterine digital scale and analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's PostHoc test.

Results: Average of uterine weight of normal control group was 0.57 ± 0.06 g, negative control group was 1.29 ± 0.30 g, positive control group was 1.15 ± 0.29 g. Intervention groups 1, 2 and 3 were 1.23 ± 0.33 g, 1.03 ± 0.23 g and 0.93 ± 0.22 g. Statistical test results of one-way ANOVA showed a significant difference of uterine weight between the six groups, $p=0.002$ ($p<0.05$). An increase of uterine weight significantly in the negative control, positive control and a group of extract 100 mg/kg when compared with the normal control. However from Post Hoc Tukey test showed that the pumpkin seed extract has not been proven that has estrogenic effect to increase the uterine weight in ovariectomized rats.

Keywords: menopause, hormone replacement therapy, estrogen, pumpkin seeds.

ABSTRAK

Latar Belakang: Sindroma menopause menjadi masalah kesehatan yang berakibat pada penurunan kualitas hidup hampir setiap wanita yang mengalaminya. Hal ini dikarenakan tidak ada lagi aktifitas hormonal yang dihasilkan ovarium, salah satunya adalah estrogen. Pemberian suplemen yang mengandung *phytoestrogen* dapat mengurangi gejala tersebut, contohnya adalah kandungan ekstrak biji labu kuning yang belum banyak digunakan di masyarakat.

Tujuan: Mengetahui efek ekstrak biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap berat uterus pada tikus ovariektomi.

Metode: Desain *true experimental in vivo* dengan rancangan *post - test only with control group design*. Subjek penelitian adalah tikus betina Sprague-Dawley, umur 8 minggu, berat 148-280 gram, 30 ekor. Kelompok meliputi kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif (estradiol 252 µg/kgBB) dan kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 (pemberian ekstrak 100, 200 dan 400 mg/kgBB). Pengumpulan data menggunakan timbangan digital. Analisis statistik *one way ANOVA* dilanjutkan *Post Hoc Tukey*.

Hasil: Rata-rata berat uterus kelompok kontrol normal $0,57\pm 0,06$ gram, kontrol negatif $1,29\pm 0,30$ gram, kontrol positif $1,15\pm 0,29$ gram. Kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 berturut-turut $1,23\pm 0,33$ gram, $1,03\pm 0,23$ gram dan $0,93\pm 0,22$ gram. Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada berat uterus setiap kelompok, yaitu $p < 0,05$ ($p = 0,002$). Berat uterus meningkat signifikan pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok pemberian ekstrak dosis 100mg/kgBB jika dibandingkan dengan kontrol normal. Namun hasil ini berkebalikan dengan hipotesis. Adapun uji *Post Hoc Tukey* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol biji labu kuning belum terbukti memiliki efek estrogenik dalam meningkatkan berat uterus pada tikus ovariektomi.

Kata Kunci: menopause, terapi sulih hormon, estrogen, biji labu kuning.

PENDAHULUAN

Sindroma menopause berupa gejala-gejala fisik maupun psikis yang merupakan akibat dari menurunnya fungsi sistem normal tubuh berdampak pula pada penurunan kualitas hidup wanita lanjut usia yang telah mengalami menopause. Selain karena faktor biologis berupa penurunan fungsi sistem tubuh, sindroma menopause ini juga dipengaruhi oleh sistem hormonal, salah satunya adalah hormon estrogen. Setelah menopause, uterus mengalami atrofi, menjadi kecil, dan vaskularisasi berkurang. Perubahan ini terjadi karena ovarium tidak lagi menghasilkan hormon estrogen dan progesteron¹.

Hormon estrogen berperan penting mempengaruhi gejala menopause. Mulai dari haid tidak teratur, penurunan fertilitas hingga berakhir dengan amenore. Selain itu, perubahan-perubahan yang khas terjadi pada masa menopause adalah adanya gejala vasomotor berupa *hot flushes* (gejolak panas) dan *night sweats* (berkeringat pada malam hari), keluhan yang bervariasi pada vagina, disfungsi seksual, inkontinensia urin, kecemasan, depresi, kelelahan, nyeri sendi dan gangguan tidur. Hal ini berdampak pula pada penurunan fungsi kognitif berupa ingatan yang menurun, serta berkurangnya massa tulang atau osteoporosis².

Menyikapi dampak dari penurunan estrogen inilah melahirkan inisiatif para peneliti untuk mengembangkan terapi sulih hormon guna meningkatkan kualitas hidup wanita menopause. Beberapa penelitian telah membuktikan efek estrogenik terapi sulih hormon yang dapat mengatasi gejala vasomotor pada wanita menopause. Namun demikian, efek samping dari terapi sulih hormon estrogen perlu diperhatikan, diantaranya meningkatnya resiko kanker endometrium, *deep venous thromboembolism*, kanker payudara, penyakit kandung empedu dan stroke. Banyaknya efek samping ini mengurangi efektifitas terapi sulih hormon³.

Berkembang pula terapi sulih hormon berbasis herbal yang diambil dari tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen. Fitoestrogen diketahui memiliki aktivitas estrogenik karena memiliki kesamaan struktur dengan estrogen alami, meskipun efek estrogeniknya lebih kecil dibanding yang alami⁴. Obat tradisional berupa ekstrak herbal dari berbagai bahan alami juga berkembang di Indonesia. Beberapa bahan alami telah

diteliti dan mempunyai efek terapi yang diharapkan bisa menjadi solusi pengobatan, salah satunya dari ekstrak biji buah Labu Kuning (*Cucurbita moschata*).

Saat ini di Indonesia banyak produsen makanan yang berbahan dasar labu kuning atau waluh yaitu tepung labu kuning, juga berbagai makanan olahan seperti wingko waluh, pia waluh, geplak waluh dan egg roll waluh. Akan tetapi, biji dari buah ini belum dimanfaatkan secara optimal. Biji labu kuning ini mengandung senyawa glikosida fenolik yang termasuk golongan flavonoid atau isoflavon^{5,6}.

Isoflavon atau fitoestrogen memiliki struktur yang mirip dengan estrogen alami sehingga dapat berikatan dengan reseptor estrogen di dalam tubuh sebagai bagian dari aktivitas hormonal. Pada saat kadar estrogen turun, akan terdapat banyak kelebihan reseptor estrogen yang tidak terikat. Meskipun afinitasnya rendah, isoflavon masih bisa berikatan dengan reseptor tersebut. Jika tubuh mendapatkan asupan isoflavon atau fitoestrogen yang cukup pada saat estrogen turun, maka akan terjadi pengaruh pengikatan isoflavon dengan reseptor estrogen sehingga akan dapat meningkatkan kadar estrogen⁷.

Selain berperan dalam aktivitas hormonal, isoflavon atau flavonoid juga berperan dalam memodulasi fungsi kekebalan tubuh, mempunyai efek anti-inflamasi, dan efek ini telah dibuktikan pada hewan model⁸. Flavonoid dapat mengurangi terjadinya hiperpermeabilitas dan edema pada endotelium mikrovaskular. Flavonoid ini juga memiliki kemampuan memblok siklooksigenase dan lipooksigenase asam arakidonat sehingga sintesis PGE₂, leukotrien, histamin, bradikinin dan tromboksan terhambat⁹. Adanya kemampuan flavonoid dalam menghambat sintesis mediator inflamasi inilah yang berperan dalam mengurangi edema. Selain menghambat metabolisme asam arakidonat, flavonoid juga menghambat sekresi enzim lisosom yang merupakan mediator inflamasi. Penghambatan mediator inflamasi ini dapat menghambat proliferasi dari proses radang¹⁰.

Sejauh ini penelitian mengenai efek estrogenik ekstrak biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) ini belum pernah dilakukan sehingga sangat menarik untuk diteliti. Penelitian ini akan dilakukan pada tikus betina yang diovariectomi sebagai model menopause, untuk mengetahui efek ekstrak biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) terhadap berat uterus pada tikus ovariectomi.

Adapun mengenai dosis, penelitian ini menggunakan estradiol sebagai kontrol positif dengan pemberian sebanyak 252 µg/kgBB dikonversi dari dosis pada manusia menggunakan rumus konversi perhitungan dosis antar jenis hewan oleh Laurence & Bacharach (1964). Sedangkan dosis pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan, didasarkan pada penelitian oleh Sharma, et al., (2013) yang menunjukkan dosis optimal pemberian ekstrak biji labu kuning (*Cucurbita maxima*) pada dosis 200 mg/kgBB¹¹. Maka dari itu pada penelitian ini menggunakan 3 rentang dosis, yaitu 100 (setengah dosis optimal), 200 (satu dosis optimal) dan 400 (dua kali dosis optimal) masing-masing dalam mg/kgBB. Peneliti tidak menggunakan dosis yang terlalu tinggi karena dipertimbangkan juga konversinya terhadap manusia. Jika dosis terlalu tinggi, akan melampaui dosis optimal jika diberikan pada manusia.

Beberapa tanaman dengan kenaikan dosis yang tinggi belum tentu disertai efek yang tinggi. Hal ini disebabkan karena selain senyawa aktif yang dikandung oleh tanaman tersebut, terdapat pula senyawa lain yang bisa mengganggu keefektifan dari senyawa aktif yang ada.

Penelitian ini akan dilakukan pada tikus betina yang diovariectomi sebagai model menopause. Tidak dilakukan terhadap manusia dengan alasan etika serta keterbatasan tempat dan waktu.

Tikus putih merupakan salah satu hewan percobaan yang biasa digunakan dalam berbagai penelitian. Hewan ini telah diketahui memiliki kemiripan dengan manusia baik sifat, karakteristik, serta struktur anatomi dan zat gizi yang diperlukan¹². Tikus memiliki rentang hidup dalam penangkaran mencapai 2–3,5 tahun. Pada tikus betina, masa pubertas terjadi pada usia 34-38 hari atau setara dengan \pm 5 minggu. Pada usia ini tikus telah berada dalam masa reproduksi dengan siklus estrus 4-6 hari. Adapun menopause terjadi pada usia 450-540 hari atau setara dengan \pm 64 – 77 minggu¹³.

MATERIALS AND METHOD

Desain penelitian *experimental in vivo* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*.

Subjek uji adalah tikus betina galur Spraque-Dawley, umur 8 minggu, berat badan 148-280gram, sebanyak 30 ekor. Kelompok penelitian terdiri dari kontrol normal, kontrol negatif (ovariectomi), kontrol positif (ovariectomi + pemberian estradiol 252 μ g/kgBB) dan kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 (ovariectomi + pemberian ekstrak biji labu kuning berturut-turut 100, 200 dan 400 mg/kgBB).

Subjek penelitian diaklimatisasi selama 1 minggu kemudian ditimbang. Pada hari ke-7, 25 ekor tikus diantaranya dilakukan ovariectomi yaitu diinjeksikan anastesi Ketamin dengan dosis sesuai BB hewan uji. Setelah tikus teranastesi, di bagian perut dicukur dengan silet untuk mempermudah proses pembedahan, lalu proses ovariectomi dimulai dengan membuat sayatan pada bagian perut dengan menggunakan gunting bedah lalu dicari ovariumnya kemudian diovariectomi. Luka bedah diolesi dengan povidon iodine untuk mencegah infeksi pasca pembedahan. Sayatan kemudian dijahit dengan menggunakan benang larut kulit (*catgut*). Tikus yang telah diovariectomi diberi injeksi Procain Penicillin untuk mencegah infeksi. Selanjutnya dipelihara selama 20 hari untuk mendapatkan efek menopause.

Setelah menopause, hewan uji diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol biji labu kuning dengan teknik penyondean (pemberian secara oral) selama 30 hari. Pembagian kelompok sebagai berikut :

Tabel 1. Jumlah dan Pembagian Kelompok Sampel Penelitian

No	Kode	Kelompok	Jumlah
1	K0	Kontrol Normal	5
2	K-	Kontrol Negatif Ovariectomi	5
3	K+	Kontrol Positif Ovariectomi + Estradiol 252 μ g/kgBB	5
4	P1	Ovariectomi + Ekstrak <i>C. moschata</i> 100/mgkgBB	5

5	P2	Ovariectomi Ekstrak <i>C. moschata</i> 200/mgkgBB	+	5
6	P3	Ovariectomi Ekstrak <i>C. moschata</i> 400/mgkgBB	+	5
Total				30

Subjek diberi perlakuan sesuai kelompok masing-masing selama 30 hari. Setelah 30 hari, tikus dikorbankan pada hari ke-31, diambil uterusnya kemudian diukur berat basahnya dan dicatat datanya.

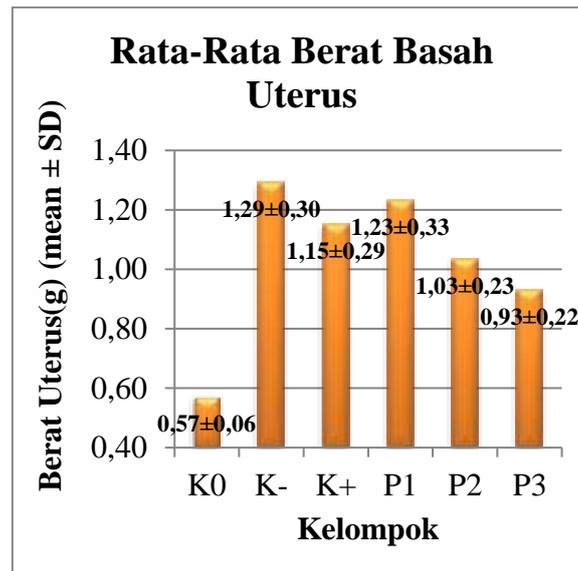
Data pada penelitian ini dianalisis menggunakan aplikasi SPSS 15. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel < 50 . Berhubung persebaran data normal, maka data dianalisis dengan *one way ANOVA* karena jenis hipotesis pada penelitian ini adalah komparatif tidak berpasangan dengan kelompok sampel > 2 . Apabila terdapat perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui letak perbedaan masing-masing kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perhitungan berat basah uterus dilakukan setelah semua kelompok diberi perlakuan selama 30 hari. Pada hari ke-31, tikus dikorbankan kemudian dinding abdomen dibuka dengan alat bedah minor dan dilakukan pengambilan uterus. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap berat basah uterus menggunakan timbangan digital (ketelitian hingga 0,001 gram). Berikut hasil penghitungan berat basah uterus:

Tabel 2. Rata-Rata Berat Basah Uterus

Kelompok perlakuan	Rata-rata berat basah uterus (g) (mean \pm SD)
K0	0,57 \pm 0,06
K-	1,29 \pm 0,30
K+	1,15 \pm 0,29
P1	1,23 \pm 0,33
P2	1,03 \pm 0,23
P3	0,93 \pm 0,22



Gambar1. Grafik Rata-Rata Berat Basah Uterus

Keterangan :

K0 : kontrol normal tanpa perlakuan

K- : kontrol negatif (ovariektomi)

K+ : kontrol positif (ovariektomi + estradiol 252 µg/kgBB)

P1 : perlakuan 1 (ovariektomi + ekstrak biji labu kuning 100 mg/kgBB)

P2 : perlakuan 2 (ovariektomi + ekstrak biji labu kuning 200 mg/kgBB)

P3 : perlakuan 3 (ovariektomi + ekstrak biji labu kuning 400 mg/kgBB)

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata berat basah uterus kelompok kontrol normal adalah 0,57 gram. Pada kelompok kontrol negatif sebesar 1,29 gram. Pada kontrol positif memberikan angka 1,15 gram. Kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak biji labu kuning berturut-turut 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB adalah 1,23 gram, 1,03 gram dan 1,93 gram.

Uji statistik pada penelitian ini diawali dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* yang menyatakan bahwa persebaran data normal yaitu $p = 0,466$ ($p > 0,05$). Adapun uji statistik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($<0,05$), menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan pada berat basah uterus antara lima kelompok perlakuan yaitu $p = 0,02$ ($p < 0,05$).

Setelah diketahui adanya perbedaan yang signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan *Post Hoc Tukey HSD test* untuk memperoleh hasil *Multiple Comparison test*. Metode *Post Hoc* ini digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes *ANOVA*. Berikut hasil uji *Post Hoc Tukey* :

Tabel 3. Uji Perbandingan Berat Basah Uterus Antar Kelompok

	K0	K-	K+	P1	P2	P3
K0	-	0,002*	0,017*	0,005*	0,082	0,268
K-	0,002*	-	0,948	0,999	0,614	0,260
K+	0,017*	0,948	-	0,995	0,979	0,753
P1	0,005*	0,999	0,995	-	0,822	0,445
P2	0,082	0,614	0,979	0,822	-	0,986
P3	0,268	0,260	0,753	0,986	0,986	-

Keterangan :

$p^* < 0,05$ = terdapat perbedaan yang bermakna

$p > 0,05$ = tidak terdapat perbedaan yang bermakna

1. Kelompok kontrol normal berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB
2. Kelompok kontrol normal tidak berbeda signifikan dengan kelompok pemberian ekstrak dosis 200 mg/kgBB
3. Kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
4. Kelompok kontrol negatif tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif, kelompok pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB, dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB
5. Kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
6. Kelompok kontrol positif tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB, dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB
7. Kelompok pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal
8. Kelompok perlakuan ekstrak dosis 100 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB
9. Kelompok perlakuan ekstrak dosis 200 mg/kgBB tidak berbeda signifikan kelima kelompok yang lain
10. Kelompok perlakuan ekstrak dosis 400 mg/kgBB tidak berbeda signifikan kelima kelompok yang lain

Dari hasil penelitian didapatkan kelompok kontrol negatif (K-) menunjukkan hasil paling tinggi. Berdasar teori, tikus yang diovariectomi (K-) seharusnya memiliki berat uterus yang lebih rendah karena atrofi uterus dibandingkan tikus pada kelompok kontrol normal (K0) yang tidak diovariectomi karena tidak ada hormon estrogen yang dihasilkan ovarium. Peningkatan berat uterus pada kontrol negatif ini mungkin disebabkan karena timbulnya edema akibat inflamasi karena prosedur ovariektomi yang telah dilakukan, atau bisa juga inflamasi akibat ketidak sterilan alat saat pembedahan tikus, bukan karena faktor fisiologis hormonal.

Adapun pemberian estradiol (kelompok K+) pada penelitian ini didapatkan hasil berupa penurunan terhadap berat basah uterus jika dibandingkan dengan tikus ovariektomi (K-). Seharusnya jika memang yang diharapkan dari estradiol adalah efek estrogen, maka berat basah uterus kelompok yang diberi estradiol lebih tinggi dari kelompok tikus ovariektomi.

Sedangkan pemberian ekstrak biji labu kuning pada penelitian ini (kelompok P1, P2 dan P3) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terhadap berat basah uterus jika dibandingkan dengan kontrol negatif ovariektomi (K-). Dari hasil analisis statistik menunjukkan berat basah uterus tikus ovariektomi pada perlakuan P1 mengalami penurunan, pada kelompok perlakuan P2 juga mengalami penurunan dan lebih rendah dari P1, serta pada kelompok perlakuan P3 menunjukkan hasil yang paling kecil dibandingkan kelompok P1 dan P2. Secara teoritis seharusnya semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin baik dalam meningkatkan berat basah uterus pada tikus ovariektomi. Namun pada hasil penelitian ini demikian, justru berkebalikan, semakin besar dosisnya maka semakin ringan uterusnya. Hal ini bisa jadi disebabkan karena dosis yang diberikan masih kurang tepat mengingat rendahnya afinitas isoflavon yang terkandung pada ekstrak biji labu kuning terhadap reseptor estrogen dalam tubuh tikus sehingga belum bisa memberikan efek peningkatan berat basah uterus tikus ovariektomi jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Namun demikian, peneliti lebih cenderung berasumsi bahwa penyebab ketidak sesuaian hasil penelitian ini mengarah ke timbulnya edema akibat inflamasi karena prosedur ovariektomi atau ketidak sterilan alat bedah.

Jika ditinjau dari segi inflamasi baik karena proses ovariektomi atau karena infeksi akibat ketidak sterilan alat, maka peneliti mengira bahwa estradiol dan ekstrak biji labu kuning memiliki efek antiinflamasi karena dapat menurunkan berat basah uterus, mengingat salah satu tanda inflamasi yaitu adanya edema atau pembengkakan yang terjadi pada jaringan yang mengalami inflamasi, dimana pada penelitian ini pembengkakan tersebut menyebabkan peningkatan berat basah uterus. Meski demikian, perkiraan ini masih bersifat sementara dan membutuhkan penelitian lebih lanjut, karena penurunan berat uterus ini pun tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

Sebuah penelitian menunjukkan bahwa isoflavon atau flavonoid berperan dalam memodulasi fungsi kekebalan tubuh, mempunyai efek anti-inflamasi, dan efek ini telah dibuktikan pada hewan model¹⁴. Flavonoid dapat mengurangi terjadinya hiperpermeabilitas dan edema pada endotelium mikrovaskular. Flavonoid ini juga memiliki kemampuan memblokir siklooksigenase dan lipooksigenase asam arakidonat sehingga sintesis PGE₂, leukotrien, histamin, bradikinin dan tromboksan terhambat¹⁵. Adanya kemampuan flavonoid dalam menghambat sintesis mediator inflamasi inilah yang berperan dalam mengurangi edema. Selain menghambat metabolisme asam arakidonat, flavonoid juga menghambat sekresi enzim lisosom yang merupakan mediator inflamasi. Penghambatan mediator inflamasi ini dapat menghambat proliferasi dari proses radang¹⁶.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat perbedaan bermakna berat basah uterus dari keenam kelompok (uji ANOVA $p < 0,05$)

2. Kelompok kontrol normal (K0) berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+) dan kelompok pemberian ekstrak dosis 100 mg/kgBB (P1)
3. Pemberian ekstrak etanol biji Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) belum terbukti dapat meningkatkan berat uterus tikus ovariektomi.

Saran

Dari hasil penelitian yang dilakukan, maka peneliti memiliki beberapa saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan uji keberhasilan ovariektomi jika akan melakukan penelitian sejenis.
2. Perlu dilakukan penelitian sejenis dengan dosis yang sekiranya optimal.

REFERENCES

1. Snell, R. S. (2006). Anatomi Klinik untuk Mahasiswa Kedokteran Edisi 6. Jakarta: EGC.
2. Prawirohardjo, S., & Wiknjosastro, H. (2011). Perempuan dalam Berbagai Masa Kehidupan. In Ilmu Kandungan (pp. 92-110). Jakarta: PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.
3. Manson, J. E., & Martin, K. (2001). Postmenopausal Hormone Replacement Therapy. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 345, No. 1, 34-40.
4. Nurliani, A. (2007, Juli). Penelusuran Potensi Antifertilitas Kulit Kayu Durian (*Durio zibethinus Murr*) melalui Skrining Fitokimia. In Sains dan Terapan Kimia (pp. 53-58).
5. Koike, K., Li, W., Liu, L., Hata, E., & Nikaido, T. (2005). New phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *PubMed Vol. 53 (2)*, 225-228.
6. Li, F., Xu, J., Dou, D., XF., C., Kang, T., & Kuang, H. (2009). Structures of new phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *PubMed Vol. 4 (4)*, 511-512.
7. Cahyati, Y., Santoso, D. R., & Juswono, U. P. (2013). Efek Radiasi pada Penurunan Estrogen yang Disertai Konsumsi Isoflavon untuk Mencegah Menopause Dini pada Terapi Radiasi. *NATURAL B.*, Vol. 2, No. 2, 109-116.
8. Sakai, T., & Kogiso, M. (2008). Soy Isoflavons and Immunity. *The Journal of Medical Investigaion vol. 55*, 167-173.
9. Sabir, A. (2007). Inflammatory Response on Rat's Dental Pulp Following Application of Propolis-Derived Flavonoids Extract. *Dentika Dental Journal Vol 12*, 34-37.
10. Fridiana, D. (2012). Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus L*) pada Kaki Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Karagen. Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
11. Sharma, A., Sharma, A. K., Chand, T., Khardiya, M., & Yadav, K. C. (2013). Antidiabetic and Antihyperlipidemic activity of *Cucurbita maxima* Duchense (Pumpkin) Seeds on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Vol 1. No.6*, 108-116.
12. Wiyatna, F., Warsono, I. U., & Parakkasi, A. (2009). Pengaruh Tepung Cangkang Rajungan (*Portunus pelagicus*) sebagai Sumber Kitin dalam Ransum terhadap

- Kandungan Lemak Feses dan Efisiensi Pakan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar. 3.
13. Sengupta, P. (2011). A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *Biomedicine International* vol. 2, 81-89.
 14. Sabir, A. (2007). Inflammatory Response on Rat's Dental Pulp Following Application of Propolis-Derived Flavonoids Extract. *Dentika Dental Journal* Vol 12, 34-37.
 15. Sakai, T., & Kogiso, M. (2008). Soy Isoflavons and Immunity. *The Journal of Medical Investigation* vol. 55, 167-173.
- Fridiana, D. (2012). Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L) pada Kaki Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Karagen. *Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember*.