

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI KLABET (*Trigonella foenum-graecum* L.) TERHADAP PERKEMBANGAN UTERUS TIKUS PUTIH BETINA GALUR WISTAR PREPUBERTAL

Kurnia Agustini, Sumali Wiryowidagdo*, Dadang Kusmana**

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT.

*Departemen Farmasi, F-MIPA Universitas Indonesia.

**Departemen Biologi, F-MIPA Universitas Indonesia.

Abstract

Phytoestrogen is the chemical compound contains in plant which has estrogenic like effect. Estrogen has important function on woman's sexual organ, such as proliferation of uterine and vaginal cornification. Phytoestrogen are weak agonists for estrogen and illicit statistic significantly increases in uterine wet weight, at definite dose, in uterotherphic bioassay. Biji Klabet or Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) contains steroidal sapogenins such as diosgenin, tigogenin, gitogenin, yamogenin and trigoneoside, that suspected having an estrogen-like effect or as phytoestrogen. The aim of this research was to investigate the estrogenic effect of fenugreek's ethanolic extract in immature rat models. These models represent the climacteric/menopause phase, where estrogen level is very low because ovary produces no estrogen. The testing animals were divided into five groups, namely normal group, estradiol control group and three level doses of fenugreek extract (30mg/200gBW; 60mg/200gBW and 120mg/200gBW). The result indicated that on 120mg/200gBW, fenugreek extract significantly ($\alpha=0.05$) increasing wet weight uterine and proliferation of uterine, such as uterine thickness and uterine diameters. Fenugreek extract, start on 60mg/200gBW, also induces vaginal lubrication and estrus cycle.

Kata Kunci : Berat basah uterus, biji klabet, endometrium, fitoestrogen, tikus prepubertal, *Trigonella foenum graecum* L.

1. PENDAHULUAN

Biji klabet atau Foenigraeci semen (*Fenugreek*) adalah biji yang dikeringkan dari tanaman *Trigonella foenum-graecum* L. suku Leguminosae, (MMI, 1979). Biji klabet diduga memiliki potensi efek estrogenik pada tubuh karena kandungan beberapa sapogenin steroidnya yaitu diosgenin, yang merupakan prekursor pembentukan hormon seks (Evans, 2002), isomernya yamogenin (Dewick, 1997), gitogenin dan tigogenin, serta trigoneosida (saponin steroid mirip estrogen) yang memiliki efek sebagai fitoestrogen untuk terapi pada pengobatan simptom menopause (Hoffman, 2004). Kandungan diosgenin-nya terdapat dalam bentuk basa bebas 0,8 – 2,2 % (Wiryowidagdo,

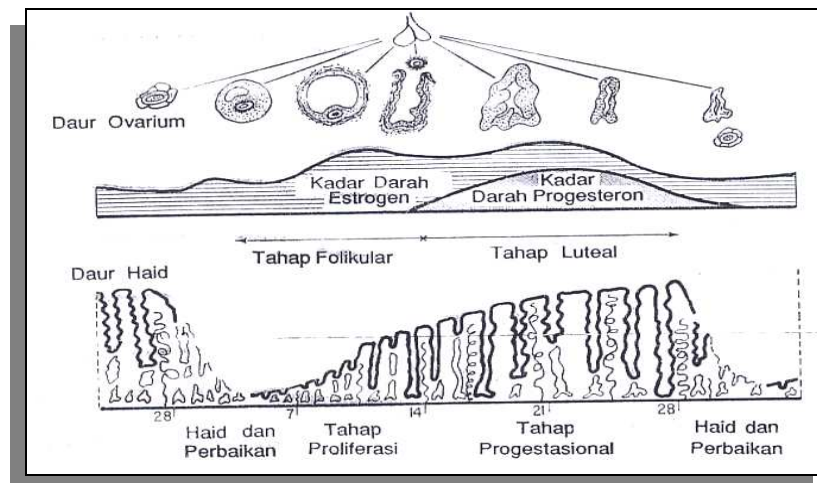
2000). Selain sapogenin steroid, biji Klabet mengandung minyak lemak 20-30%, alkaloid (trigonellin, suatu alkaloid piridina, gentianin dan karpain), flavonoid seperti vitexin dalam bentuk glikosida dan esternya, isovitexin, orientin, vicenins, kuersetin dan luteolin (Hoffman, 2004), minyak atsiri, saponin, nikotinamida, kholin, zat pahit dan zat lendir (Evans, 2002). Biji Klabet dapat menyebabkan kontraksi uterus sehingga tidak dianjurkan dikonsumsi pada masa kehamilan (Hoffman, 2004).

Fitoestrogen digunakan sebagai alternatif Terapi Sulih Hormon (TSH) untuk membantu penyesuaian tubuh dan mengurangi gejala karena perubahan hormonal yang drastis pada masa

menopause, dapat digunakan jangka panjang selama beberapa tahun hingga tubuh dapat beradaptasi pada tingkat hormonal yang baru (Badziad, 2003). Salah satu efek estrogen terhadap uterus adalah menyebabkan proliferasi endometrium yang nyata dan perkembangan kelenjar endometrium yang kelak akan digunakan untuk membantu nutrisi ovum yang berimplantasi (Guyton, 1995). Uterus adalah salah satu saluran reproduksi wanita selain tuba fallopi, serviks dan vagina. Perubahan struktur dan fungsi uterus ditentukan oleh siklus hormonal wanita. Pada setiap siklus, awalnya fungsi uterus menyiapkan penerimaan dan transportasi spermatozoa dari serviks ke tuba fallopi. Bila terjadi pembuahan, pada masa kehamilan, uterus menjadi tempat tumbuhnya zygot, hingga kelahiran tiba (Johnson, 1980).

Secara histologi, dinding uterus terdiri dari tiga lapisan. Lapisan pertama adalah membran serosa yang merupakan dinding terluar dari uterus. Lapisan kedua adalah miometrium, berupa lapisan otot polos yang terdiri dari tiga lapis dari luar ke dalam yaitu serabut-serabut otot polos yang berjalan longitudinal, lapis tengah yang mengandung urat syaraf dan pembuluh darah, serta lapisan serabut otot polos yang berbentuk sirkular. Lapisan ketiga adalah endometrium,

lapisan yang merupakan dinding lumen uterus dan terdiri atas epitel, lapisan kelenjar-kelenjar uterus dan tenunan pengikat (Partodihardjo, 1992). Aktivitas siklus uterus non pregnant (tak hamil) dapat dibagi dalam tiga stadium, yaitu stadium proliferasi (folikular), stadium sekretori atau luteal, dan stadium menstruasi. Siklus uterus non pregnant dapat dilihat pada Gambar 1. Setiap stadium memiliki tipe dinding uterus yang berlainan. Fase folikuler dimulai pada akhir perdarahan menstruasi dan ditandai oleh regenerasi cepat endometrium. Sel epitel dan sisa kelenjar yang telah terlepas selama fase menstruasi terbentuk kembali pada permukaan mukosa endometrium (Leeson, 1986). Pada stadium sekretoris, endometrium menjadi bertambah tebal, karena meningkatnya aktivitas sekretoris kelenjar dan cairan edema dalam stroma. Sel-sel kelenjar mengalami hipertrofi karena berkumpulnya sejumlah besar hasil sekresi. Kelenjar menjadi berkelok-kelok, lumen melebar dan sering terisi dengan sekret. Dalam stroma, cairan jaringan bertambah banyak menyebabkan edema.



Gambar 1. Perubahan endometrium wanita selama siklus menstruasi (Leeson, 1986).

Pada stadium menstruasi, epitel dan jaringan pada permukaan endometrium banyak mengalami pelepasan dan keluar sebagai sekret menstruasi. Setelah fase ini dilanjutkan kembali dengan fase folikuler (diFiore, 1986).

Dalam rangka pengembangan fitofarmaka fitoestrogen dari tanaman asli Indonesia, maka perlu kiranya dilakukan penelitian praklinik dan klinik. Pengujian praklinik meliputi pengujian khasiat dan

toksitas, melalui penelitian eksperimental menggunakan hewan uji. Pengujian khasiat ini bertujuan untuk mengetahui efek estrogenik dari pemberian ekstrak biji klabet sebagai salah satu sumber fitoestrogen. Penelitian ini menggunakan model hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar prepubertal yang masih berusia 19 hari dan belum memiliki siklus hormonal. Model hewan uji tersebut diharapkan dapat mewakili kondisi

menopause, yaitu terjadinya kadar estrogen yang sangat rendah (Kanno, 2001). Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah membandingkan perkembangan uterus, yang meliputi berat basah uterus, diameter uterus, diameter endometrium dan tebal endometrium, serta lubricasi vagina dan siklus estrus antar kelompok uji. Parameter tersebut diharapkan dapat memberikan informasi yang saling menunjang untuk mengetahui efek estrogenik dari biji klabet.

Data yang yang diperoleh dapat menjadi informasi mengenai aktivitas Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.), suatu tanaman lokal Indonesia, sebagai fitoestrogen, sehingga dapat menjadi data pelengkap bagi uji klinis atau penelitian selanjutnya dalam rangkaian pencarian fitofarmaka fitoestrogen sebagai alternatif Terapi Sulih Hormon (TSH).

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Simplisia Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L) dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawang mangu, Solo. Hewan uji tikus putih betina dan jantan galur Wistar berusia 4 bulan, dengan berat badan 150 – 200 gram berasal dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (Puslitbang Gizi FK-UI), Jakarta. Bahan pembuatan ekstrak uji: etanol destilat 96%, kertas saring, akuades, larutan Natrium Karboksi Metil Selulosa (CMC Na) 0,5%. Sediaan pembeding estradiol, Lynarol[®]

Bahan pembuatan preparat apusan vagina: *cotton swab*, gelas obyek, larutan NaCl fisiologis, metanol, larutan pewarna Giemsa. Bahan pengawet organ : larutan Bouin (Asam asetat glasial, kristal asam pikrat, formalin), etanol 70%, pot plastik. Bahan pembuatan preparat histopatologi : metanol absolut, parafin, gelas obyek dan kaca penutupnya, albumin, pereaksi perekat Albumin-Mayer (Albumin telur, gliserin, timol), xylene, Larutan alkohol berbagai konsentrasi (30%, 50%, 70%, 80%, 96%), Balsem Kanada, Akuades, Kertas saring, kapas. Pereaksi warna preparat histopatologi : Ehrlich hematoksilin, larutan eosin 0,5% dalam etanol 70%.

2.2. Alat

Alat pembuat ekstrak uji: timbangan, *blender* kering, alat-alat gelas (erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, corong), *homogenizer* Heidolph[®], *rotary evaporator* Heidolph[®]. Alat perlakuan hewan uji: kandang hewan uji, timbangan hewan, timbangan analitik,

sonde lambung, alat gelas, peralatan bedah. Mikroskop dilengkapi kamera Olympus[®]. Mikroprojektor Ken-A-Vision[®] X-1000-1. Alat pembuatan preparat histopatologi: oven, mikrotom, *staining jar/bejana* pereaksi warna, *hot plate*, lampu spiritus, spatula, kuas, pipet tetes.

2.3. Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak uji dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT, Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang. Pembuatan dan analisis preparat histopatologis dilakukan di Laboratorium Reproduksi Biologi Perkembangan, Jurusan Biologi, F-MIPA, Universitas Indonesia, Depok

2.2. Metode

2.2.1. Determinasi Simplisia

Simplisia kering Biji Klabet (*Trigonella foenum-graecum* L.) dideterminasi di Lembaga Herbarium Bogoriense LIPI, Bogor.

2.2.2. Pembuatan Ekstrak Uji

Simplisia diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol disertai pengadukan selama 5 kali 2 jam. Filtrat dikeringkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental yang kemudian disimpan dalam desikator hingga berat tetap.

2.2.3. Penyiapan Hewan Uji Tikus Prepubertal

Untuk mendapatkan model hewan uji prepubertal, dilakukan pengembang biakkan tikus putih betina galur Wistar, yang berumur 4 bulan, dengan berat badan 150 – 200 gram. Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu selama 7 hari untuk membiasakan dengan lingkungan laboratorium. Tikus yang terlihat sakit, bulu berdiri dan tidak aktif, tidak digunakan dalam penelitian. Pengembang biakkan dilakukan dengan mengawinkan tikus putih betina dengan jantan dari galur yang sama (satu kandang terdiri dari 2 ekor betina dan satu ekor jantan) selama 7 hari. Kemudian induk dipisahkan dalam kandang tersendiri selama masa bunting 21 hari. Setiap tanggal kelahiran dicatat untuk memastikan usia setiap anak tikus. Anak tikus betina yang berumur 19 hari kemudian dipakai sebagai model penelitian ini.

2.2.4. Perlakuan ekstrak uji:

Tikus betina prepubertal dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan secara acak, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor, yaitu:

- Kelompok I (N) : Kelompok normal, perlakuan CMC Na 0,5%
- Kelompok II (KE2) : Kelompok kontrol estradiol 0,9µg/200gBB
- Kelompok III (D1) : Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 1 (30 mg/200gBB)
- Kelompok IV (D2) : Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 2 (60 mg/200gBB)
- Kelompok V (D3) : Kelompok perlakuan ekstrak uji dosis 3 (120 mg/200gBB)

Pemberian ekstrak uji secara oral menggunakan sonde lambung sesuai dosis pada masing-masing kelompok, satu kali sehari, selama 16 hari berturut-turut. Pada hari ke 13, 14, 15, dan 16, diambil preparat apusan vagina. Pada hari ke-17, seluruh hewan coba dibedah dan diambil uterusnya.

2.2.5. Analisis Preparat Apusan Vagina (Martin, et.al, 1990)

Preparat apusan vagina dibuat dengan cara mengoleskan kapas (*cotton swab*) yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9% ke dalam vagina tikus. Hasil yang didapat dioleskan pada gelas objek. Preparat dibuat setipis mungkin, kemudian difiksasi dengan menggunakan metanol selama 15 menit, lalu dicuci dengan akuades. Preparat diwarnai dengan cara pewarnaan Giemsa. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

2.2.6. Analisis Berat Basah Uterus (Owens 2003)

Segera setelah pembedahan, uterus diletakkan diatas kertas saring untuk dibersihkan dari darah dan cairan tubuh. Selanjutnya, uterus ditimbang untuk mendapatkan data Berat Basah Uterus (*Wet Weight Uterin*).

2.2.7. Analisis Struktur Histologi Uterus (Suntoro, 1983)

Segera setelah pembedahan dan penimbangan, organ uterus direndam dalam larutan bouin selama 24 jam, kemudian larutan pengawet diganti dengan etanol 70%. Pembuatan preparat histologis menggunakan metode parafin dengan pewarnaan haematoksilin-eosin.

2.2.8. Pengolahan data

Data kuantitatif yang diperoleh dari pengukuran berat basah uterus, diameter uterus, diameter endometrium dan tebal endometrium dianalisis secara statistik menggunakan program komputer *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 11,5 for windows* dengan pendekatan uji nilai probabilitas (P). Hasil uji disimpulkan dengan cara membandingkan nilai taraf nyata (α) dengan P yang diperoleh melalui komputasi SPSS (Sulaiman 2003).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Model hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih betina prepubertal yang baru berusia 19 hari. Berdasarkan data biologi, pada usia 19 hari tikus sudah dapat disapih atau dipisahkan dari induknya. Pada kondisi ini diperkirakan tikus belum memiliki siklus hormonal yang normal. Hal ini dapat dilihat dari preparat apusan vagina tikus pada kelompok normal prepubertal. Pada preparat tersebut tidak terdapat tiga jenis sel (sel epitel, sel yang terkornifikasi dan sel leukosit) yang biasa ada pada lapisan mukosa vagina tikus betina dewasa. Analisis apusan vagina dilakukan pada empat hari sebelum pembedahan (empat hari sebelum perlakuan berakhir) dan bertujuan untuk mengetahui adanya siklus estrus pada masing-masing kelompok serta adanya efek estrogenik pada vagina. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa hingga usia 35 hari (tikus prepubertal usia 19 hari yang telah mengalami perlakuan 16 hari) tikus belum mengalami pubertas. Secara umum, tikus putih betina baru bisa dikawinkan dengan jantannya pada usia 10 minggu atau 70 hari (Smith, 1998).

Data hasil analisa preparat apusan vagina dapat dilihat pada tabel 1 (Lampiran). Pada kelompok kontrol yang diberi estradiol, kelompok perlakuan dosis 3 (120mg/200gBB) serta sebagian kelompok perlakuan dosis 2 (60mg/200gBB), telah terjadi lubrikasi vagina yang nyata dan ditemukan ketiga jenis sel yang biasa ada pada siklus estrus. Salah satu efek estrogenik adalah mengubah epitel vagina dari kuboid menjadi berlapis (Guyton, 1995). Dengan demikian data ini membuktikan bahwa mulai dosis 60mg/200gBB ekstrak biji klabet dapat memberikan efek estrogenik terhadap vagina tikus prepubertal.

Hasil pengukuran berat basah uterus tikus betina prepubertal, pada masing-masing kelompok tertera pada Tabel 2. Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smimov menunjukkan bahwa data berat basah uterus tikus betina prepubertal berdistribusi normal

($\alpha = 0,05$). Hasil uji homogenitas Levene menunjukkan bahwa data kadar estradiol plasma pada tikus betina prepubertal bervariasi homogen ($\alpha = 0,05$).

Selanjutnya data dianalisis dengan uji ANAVA satu arah dan uji Beda Nyata Terkecil (*LSD Test*).

Tabel 2. Rata-rata berat basah uterus tikus betina prepubertal

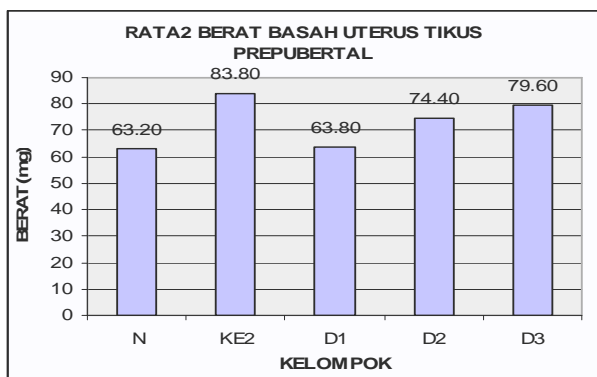
KELOMPOK TIKUS PREPUBERTAL	RATA2 BERAT BASAH UTERUS (mg)
Normal	63,20 ± 6,85
Kontrol Estradiol 0,9µg/200gBB	83,80 ± 2,40
Dosis 1 (30mg/200gBB)	63,80 ± 7,05
Dosis 2 (60mg/200gBB)	74,40 ± 11,29
Dosis 3 (120mg/200gBB)	76,60 ± 4,84

Pemberian ekstrak biji klabet pada tikus prepubertal, terutama kelompok perlakuan dosis 3 (76,60 mg) menyebabkan peningkatan berat basah uterus secara bermakna ($\alpha = 0,05$) bila dibandingkan dengan kontrol normal (63,20 mg). Peningkatan bermakna juga terjadi pada pemberian kontrol sediaan estradiol (83,80 mg). Perbandingan berat basah uterus masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2, Gambar 2 dan Gambar 3. Grafik menunjukkan bahwa peningkatan dosis juga menyebabkan peningkatan berat basah uterus.

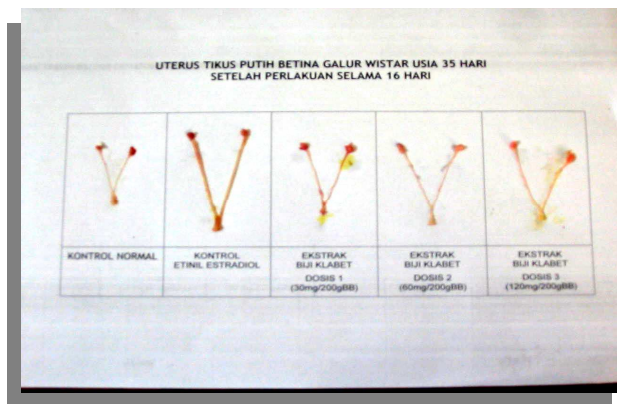
Hormon estrogen menyebabkan proliferasi yang nyata pada uterus (Guyton, 1995). Sedangkan fitoestrogen adalah agonis lemah bagi reseptor estrogen tubuh. Menurut Owen (2003), dalam suatu

penelitian uterotropik bioassay, pada dosis tertentu, fitoestrogen dapat menyebabkan peningkatan berat basah uterus secara bermakna. Selain itu, juga diketahui bahwa perbedaan berat badan merupakan salah satu faktor yang dapat menyebabkan perbedaan berat uterus.

Untuk mengetahui lebih lanjut efek estrogen maupun fitoestrogen terhadap organ uterus tikus prepubertal, kemudian dilakukan analisis preparat struktur histologi uterus, dapat dilihat pada Gambar 5. Uterus terdiri atas tiga lapisan yang dapat diamati di bawah mikroskop, pada perbesaran 100x. Ketiga lapisan tersebut adalah membran serosa, miometrium dan endometrium



Gambar 2. Grafik rata-rata berat basah uterus tikus betina prepubertal setelah diberi perlakuan



Gambar 3. Uterus tikus putih betina prepubertal setelah perlakuan 16 hari pada masing-masing kelompok uji.

Pada perkembangan uterus secara keseluruhan, estrogen memainkan peranan penting terhadap proliferasi uterus, terutama proliferasi endometrium (Leeson, 1986). Berdasarkan itu, maka analisis preparat histologi dilakukan terhadap diameter uterus, diameter endometrium dan tebal endometrium. Tabel dan Grafik perbandingan rata-rata diameter uterus, diameter endometrium dan tebal endometrium pada masing-masing kelompok, dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 4.

Perkembangan uterus (diameter uterus, diameter endometrium dan tebal endometrium) pada kelompok perlakuan sediaan estradiol secara umum menunjukkan peningkatan yang bermakna ($\alpha=0,05$) bila dibandingkan uterus kelompok kontrol prepubertal normal. Selain itu, dari Gambar 4, dapat dilihat bahwa ekstrak biji klabet berpotensi meningkatkan perkembangan uterus seiring dengan bertambahnya dosis.

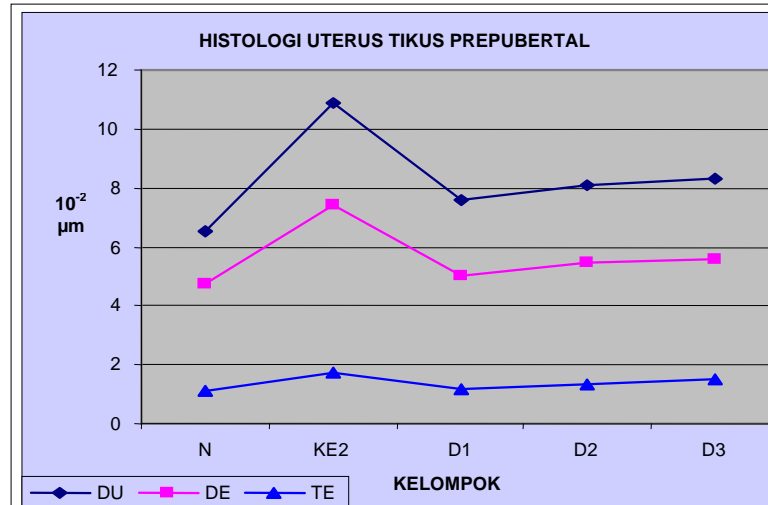
Kelompok perlakuan dosis 3 (120mg/ 200gBB) memberikan peningkatan perkembangan diameter uterus ($8,33 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}$) dan tebal endometrium (1,50

$10^{-2} \mu\text{m}$) yang bermakna ($\alpha=0,05$) dibandingkan kelompok tikus prepubertal normal, dengan diameter uterus ($6,51 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}$) dan tebal endometrium ($1,11 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}$). Tetapi efeknya terhadap perkembangan diameter endometrium tidak berbeda dibandingkan kelompok prepubertal normal, sedangkan kelompok ekstrak uji dosis 1 dan 2 belum memberikan peningkatan perkembangan uterus yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok tikus prepubertal normal. Hal ini dimungkinkan karena pada dosis 1 dan 2, senyawa fitoestrogen yang dikandung biji klabet belum mencukupi untuk berikatan dengan reseptor estrogen yang ada, sehingga belum memberikan perkembangan uterus yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol normal.

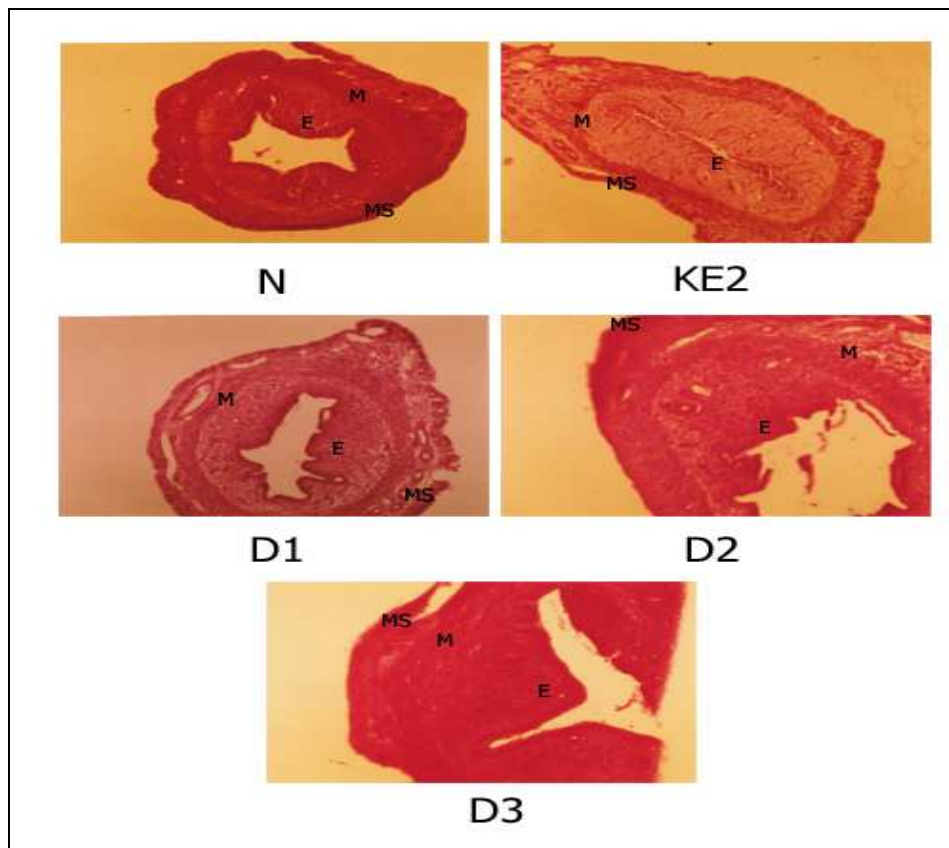
Berdasarkan pengamatan pada perkembangan uterus tikus prepubertal, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji klabet mempunyai efek estrogenik terhadap uterus, terutama pada kelompok perlakuan dosis 3 (120mg/200gBB).

Tabel 3. Data perkembangan uterus tikus prepubertal

KELOMPOK TIKUS PREPUBERTAL	DIAMETER UTERUS ($10^{-2}\mu\text{m}$)	DIAMETER ENDOMETRIUM ($10^{-2}\mu\text{m}$)	TEBAL ENDOMETRIUM ($10^{-2}\mu\text{m}$)
Normal	$6,51 \pm 1,22$	$4,77 \pm 0,87$	$1,11 \pm 0,28$
Kontrol Estradiol 0,9 μg /200gBB	$10,89 \pm 1,48$	$7,40 \pm 1,40$	$1,75 \pm 0,18$
Dosis 1 (30mg/200gBB)	$7,57 \pm 1,18$	$5,05 \pm 0,84$	$1,20 \pm 0,24$
Dosis 2 (60mg/200gBB)	$8,08 \pm 0,89$	$5,46 \pm 0,56$	$1,34 \pm 0,14$
Dosis 3 (120mg/200gBB)	$8,33 \pm 0,93$	$5,58 \pm 0,50$	$1,50 \pm 0,41$



Gambar 4. Grafik hasil analisis histologi uterus yang meliputi DU (Diameter Uterus), DE (Diameter Endometrium) dan TE (Tebal Endometrium) antar kelompok.



Keterangan: E : Endometrium
M : Myometrium
MS : Membran serosa

Gambar 5. Struktur histologi uterus tikus betina prepubertal setelah 16 hari perlakuan pada masing-masing kelompok uji.

4. KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol biji klabet dosis 120mg/200gBB pada tikus betina prepubertal menunjukkan peningkatan yang bermakna ($\alpha = 0,05$) terhadap berat basah uterus dan tebal endometrium). Selain itu, mulai dosis 60mg/200gBB, ekstrak etanol biji klabet juga menyebabkan lubrikasi vagina dan timbulnya siklus estrus pada tikus betina prepubertal.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2000. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*. BPOM Departemen Kesehatan RI, Jakarta: vi + 47 hlm.
- Anonim.1979. *Materia Medika Indonesia*. Jilid III. Departemen Kesehatan RI, Jakarta: xviii + 196 hlm.
- Anonim. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. BPOM Departemen Kesehatan RI, Jakarta: viii + 68 hlm.
- Badziad, Ali. 2003. *Endokrinologi Ginekologi*. Jakarta: Media Aesculapius. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: xxiv + 167 hlm.
- Dewick, PM. 1997. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, New York: x + 466 hlm.
- Di Fiore, Mariano SH. 1986. *Atlas Histologi Manusia*. Edisi kelima. Terj. dari *Atlas of Human Histology*, oleh Moch. Martoprawiro, dkk. EGC, Jakarta : 220-245.
- Ebadi, Manuchair. 1997. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. CRC Press, London: xxviii + 726 hlm.
- Evans, CW. 2002. *Pharmacognosy*. 15th edition. W.B. Saunders, London: xi + 585 hlm.
- Gruber, CJ, W. Tschugguel, C. Schneeberger & JC. Huber. 2002. Production and Action of Estrogens. *N. Engl. J. Med.* : 340-350.
- Guyton, C.Arthur. 1995. *Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit*. Terj. dari *Human Physiology and mechanism of disease*, oleh Petrus Andrianto. EGC, Jakarta: xii + 821 hlm.
- Hoffmann, David L., *New Holistic Herbal, Herbal Materia Medica*: 2 hlm.
- <http://www.healthworld.online/herbalmateriamedica/html>, 4 Juni 2004. 16.00 WIB
- [http://www.fenugreek.\(Trigonella.foenum.graecum/html](http://www.fenugreek.(Trigonella.foenum.graecum/html), 6 Januari 2004. 15.35 WIB.
- Johnson, Martin & B. Everitt. 1980. *Essential Reproduction*. Blackwell Scientific Publications, London: xi + 356 hlm.
- Jones, Georgeanna Seegar & Howard W. Jones. 1980. *Gynecology*. 3rd ed. Baltimore: 4 – 482.
- Kanno, J.L. Onyon, J. Haseman & P. Fenner-Crisp, J. Ashby, & W. Owens. 2001. The OECD Program to Validate Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses : Phase 1. *Environmental Health Perspectives*. Vol.109. No.8: 785-794.
- Leeson, C.Roland, TS Leeson & AA Paparo. 1986. *Buku ajar histologi*. Edisi V. Terj. dari *Textbook of histology*, oleh Koesparto Siswojo dkk. EGC. Jakarta: xi + 622 hlm.
- Loose, DS Mitchell & GM. Stancel. 2001. Estrogen and Progestin. Dalam: Gilman, Alfred G., LS. Goodman, TW. Rall & F. Murad. *Pharmacological Basic of Therapeutics*. 10th ed. Mc. Graw Hill, New York: xvi + 1839 hlm.
- Martin, Annamarie, A.S. Bingel & D.P. Waller. 1990. Bioscreening Technique for Antifertility Activity. Dalam: Thompson, Emmanuel B. *Drug Bioscreening, Drug Evaluation Techniques in Pharmacology*. VCH Publishers, New York: xvii + 288 hlm.
- Mills, Simon & K. Bone. 2000. *Principles and Practice of Phytoterapy. Modern Herbal Medicine*. Churcill Livingstone, Edinburgh: xx + 643 hlm.
- Novak, Edmund & D. Woodruff. 1979. *Gynecologic and Obstetry Pathology. with Clinical and Endocrine Relations*. 8th ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia: 157-189.
- Owens, William, J. Ashby, J. Odum & L. Onyon. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay. Phase 2: Dietary Phytoestrogen Analyses. *Environmental Health Perspectives*. Vol.111. No.12: 1559-1567.
- Partodirhardjo, Soebadi. 1992. *Ilmu reproduksi hewan*. Mutiara Sumber Widya, Jakarta : xvi + 588 hlm.
- Smith, J.B. & S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan*

- Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: 37-55.
- Sulaiman, W. 2003. Statistik non-parametrik: Contoh kasus dan pemecahannya dengan SPSS. Penerbit Andi, Yogyakarta: vi + 168 hlm
- Suntoro, Handari. 1983. *Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia)*. Penerbit Bhratara Karya Aksara, Jakarta: viii + 394 hlm.
- Trotter, Andreas, L. Maier, T. Kohn, W. Bohm & F. Pohlandt. 2002. Growth of the Uterus and Mammary Glands and Vaginal Cytologic Features in Extremely Premature Infants with Postnatal Replacement of Estradiol and Progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Vol 186. No.2:184-188.
- Turner, A Robert & P. Hebborn. 1971. *Screening methods in pharmacology*. Volume II. Academic Press, New York: xvii + 288 hlm.
- Widowati, Luci. 2003. Pengaruh Ekstrak Biji Klabet (*Trigonella Foenum-graecum L.*) Terhadap Kadar Gula Darah, Metabolisme Glutathion dan Gambaran Kerusakan Sel β Pankreas pada Tikus NIDDM. *Tesis Magister Program Pascasarjana Program Studi Ilmu kefarmasian FMIPA-UI, Depok*: ix + 108 hlm.
- Wiryowidagdo, Sumali. 2001. *Kimia dan Farmakologi Bahan Alam*. Universitas Indonesia, Jakarta: viii + 339 hlm.