

An Immunohistochemical Study of Alpha Estrogen Receptor (ER α) Development in Ovary and Uterus of Rat (*Rattus norvegicus*)

Sri Wahyuni¹, Chintya Desfariza², Hamny², Muslim Akmal³, Gholib⁴, T. Armansyah⁵

¹Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁵Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

Penulis korespondensi: Sri Wahyuni, E-mail: sriwahyuni@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

*This research aimed to observe and identify the development of estrogen receptor alpha (ER α) in the ovary and uterus of rats (*Rattus norvegicus*) at various age levels using immunohistochemistry (IHC). The ovary and uterus were collected from eight female rats aged 2, 4, 6, and > 12 months and processed histologically and stained with IHC staining. This research showed, the intensity of ER α expression was found in high abundance (++++) in stroma and the corpus luteum and was weakly found (+) in the theca cells, blood vessels, oocytes and germinal epithelium of rats aged 2 months. Additionally, ER α expression in rats aged 4 months had similarities with rats aged 2 months, but the intensity of ER α had increased (++) in ovarian theca cells, blood vessels, and oocytes. In ovaries of rats aged 6 and > 12 months, ER α expression had decreased (++) in the stroma and the corpus luteum and had a low expression (+) in the blood vessel and oocytes. The uterus of rats aged 2 months had low expression of ER α (+) in the stroma and luminal epithelium, moderate (++) in the myometrium, but was not found in the uterine glands. Furthermore, the expression in the uterus of rats at the age of 4 months had increased in the stroma and luminal epithelium (++) and uterine glands (+). At the age of 6 months, it found excessively (++++) in the stroma, myometrium, and luminal epithelium, moderate expression (++) in the uterine glands. The expression of ER α in uterus aged > 12 months was almost equal to the uterus of rats aged 6 months, but the expression in the myometrium and epithelial luminal had decreased (++) . It can be concluded that the development and distribution pattern of ER α in the ovaries and uterus of rats are different at each age levels, it may be related to the growth and development of reproductive organs and also closely related to the estrus cycles of rats.*

Key words: ER α , immunohistochemical, *Rattus norvegicus*, ovary, uterus

PENDAHULUAN

Hormon estrogen merupakan hormon reproduksi utama pada hewan betina (Brown, 1994). Hormon tersebut dihasilkan oleh sel-sel teka dan sel granulosa folikel ovarium dan dalam jumlah sedikit dihasilkan oleh korpus luteum, plasenta, korteks adrenal, dan testis (Gadjahnata, 1989). Hormon estrogen berperan dalam berbagai proses fisiologis seperti diferensiasi organ kelamin betina, siklus reproduksi dan kebuntingan (Guyton dan Hall, 2007). Pada tikus, estrogen mulai dihasilkan pada masa pubertas yaitu pada umur 8 minggu sampai

berhentinya masa reproduksi yang terjadi sekitar umur 2,5 tahun (Hafez dkk., 2000).

Efek biologis suatu hormon muncul bila terjadi ikatan antara hormon dan reseptornya (Murray dkk., 2009). Fungsi utama dari reseptor tersebut adalah sebagai faktor DNA-binding *transcription* yang mengatur ekspresi gen (Pratoko, 2012). Sebagai contoh, hormon estrogen akan aktif bekerja apabila pada organ target terdapat reseptor estrogen (ER).

Reseptor estrogen terdiri dari dua jenis, yaitu reseptor estrogen *alpha* (ER α) dan reseptor estrogen *betha* (ER β) (Ibanez dan Baulieu, 2005). Reseptor estrogen *alpha*

ditemukan pada ovarium, kelenjar mammae, uterus, testis, kelenjar hipofise, hipokampus, ginjal, epidermis, dan kelenjar adrenal, sedangkan ER β terdapat pada ovarium dan uterus (Hiroi dkk., 1999; Wang dkk., 2000; Rai dan Jeswar, 2010).

Hiroi dkk. (1999) menyatakan bahwa distribusi ER α pada ovarium tikus ditemukan pada sel-sel granulosa dan sel-sel teka folikel ovarium, sedangkan pada uterus ER α terdeteksi pada inti sel epitel kelenjar dan lapisan endometrium tikus. Menurut Wang dkk. (2000), ER α juga terdeteksi pada stroma, epitel germinal, dan oosit sedangkan pada uterus ditemukan pada bagian stroma dan miometrium.

Namun demikian beberapa studi tentang distribusi ER α pada ovarium dan uterus tikus tersebut belum mengkaji perkembangan dan distribusi ER α pada berbagai tingkatan umur tikus. Oleh karena itu, penelitian ini mengkaji perkembangan dan distribusi ER α pada organ ovarium dan uterus tikus pada berbagai tingkatan umur menggunakan teknik immunohistokimia (IHK). Teknik imunohistokimia (IHK) merupakan salah satu teknik yang dapat diaplikasikan untuk mendeteksi keberadaan ER α dan bahan aktif lainnya dalam sel atau jaringan berdasarkan adanya ikatan antara antigen dan antibodi pada jaringan yang diperiksa (Taylor, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati dan mengidentifikasi perkembangan ER α pada ovarium dan uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tingkatan umur yang berbeda secara immunohistokimia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang perkembangan ER α pada ovarium dan uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) serta memberikan pemahaman tentang peran ER α pada sistem reproduksi betina dan memberikan informasi pendukung bagi penelitian berikutnya.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Anatomi, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. Penelitian ini dimulai pada bulan Oktober 2015 sampai Januari 2016.

Hewan Percobaan

Pada penelitian ini digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar betina, umur 2 bulan, 4 bulan, 6 bulan, dan >12 bulan yang diperoleh dari Fasilitas Hewan Coba Laboratorium Farmakologi FKH Unsyiah. Setiap tingkatan umur terdiri dari dua ekor tikus.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah wadah untuk pewarnaan, kertas *tissue*, kertas label, mikrotom (Leica RM2235), pisau mikrotom, gelas objek, gelas penutup, inkubator 37°C (Sanyo MIR554), *hot plate*, penggaris, kamera digital, mikroskop foto (Olympus CX31), dan mikroskop cahaya (Olympus BX41) yang dilengkapi dengan alat mikrofotografi (DP12).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah ovarium kanan dan uterus dari tikus putih, *aquadest*, kloroform, paraformaldehid 4%, alkohol absolut, alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95%, bahan perekat *poly-L-Lysine* (Biogear), *Phosphate Buffer saline* (PBS), *normal horse serum* 2,5% (Vector, USA), antibodi anti reseptor α estrogen (Dako, USA) sebagai antibodi primer, antibodi sekunder yang telah dilabel dengan *peroxydase* (anti-goat immunoglobulin ImmPRESS™ Reagen

Peroxydase, Vector, USA), antibodi sekunder yang telah dilabel dengan biotin (monoclonal anti-rabbit immunoglobulin-biotin, Sigma, Israel), avidin peroksidase (ExtrAvidin® peroxidase, Sigma-Aldrich, Israel), kromogen diaminobenzidine (Dako, USA), Mayer's hematoksilin, dan bahan perekat Entellan®.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif untuk mendeteksi perkembangan reseptor α estrogen (ER α) pada jaringan ovarium dan uterus tikus. Tikus putih dibedah untuk memperoleh organ ovarium dan uterus yang selanjutnya diproses menjadi preparat histologi.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel ovarium tikus

Pengambilan organ ovarium dan uterus dilakukan dengan pembedahan di bagian abdomen tikus yang sebelumnya telah dianestesi dengan kloroform secara inhalasi. Organ ovarium dan uterus yang telah diperoleh serta dicuci dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan ke dalam larutan fiksasi paraformaldehid 4% selama 24 jam. Selanjutnya kedua organ tersebut dipindahakan kedalam larutan alkohol 70% sebagai *stopping poin*.

Prosedur pembuatan preparat histologi

Prosedur pembuatan preparat histologi mengacu pada metode Kiernan (1990) yang telah dimodifikasi. Organ ovarium dan uterus yang berada dilarutan alkohol 70% dimasukkan ke dalam *tissue basket* dan diberi label. Kemudian jaringan didehidrasi dengan larutan alkohol bertingkat masing-masing selama 2 jam. Setelah proses dehidrasi, dilakukan proses penjernihan dengan menggunakan larutan silol sebanyak

tiga kali ulangan. Selanjutnya dilakukan proses infiltrasi dalam parafin cair. Tahapan selanjutnya adalah proses *embedding* dalam parafin. Blok jaringan ovarium dan uterus yang telah menjadi blok disayat dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan sayatan 5 μ m dan diletakkan pada gelas objek yang telah dilapisi bahan perekat *poly-L-lysine*.

Prosedur pewarnaan IHK

Pewarnaan preparat ovarium dan uterus tikus.

Metode IHK yang digunakan adalah metode tidak langsung dua tahap (*immunoperoxidase bridge methode*) (Key, 2009) untuk pewarnaan ovarium, prosedur pewarnaan yang dilakukan mengacu pada *manual kit* Vector Lab (2014) yang telah dimodifikasi. Untuk pewarnaan organ uterus adalah metode *avidin biotin complex peroxidase (ABC)* (Hsu dkk., 1981). Tahap awal dimulai dengan proses deparafinisasi *slide* jaringan dengan silol sebanyak tiga kali ulangan. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi dalam larutan alkohol bertingkat (alkohol absolut, 95%, 90%, 80%, dan 70%), lalu dicuci dengan air mengalir dan akuades. Tahap awal pewarnaan IHK adalah proses perendaman *slide* dalam larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% yang dicampur dengan metanol dalam ruangan gelap pada suhu ruangan selama 15 menit, kemudian *slide* dibilas kembali dengan akuades dan dilanjutkan pembilasan dengan PBS. Tahap berikutnya, *slide* diinkubasi dengan *normal horse serum* 2,5% sebanyak 50-60 μ l selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah proses inkubasi, *slide* dibilas kembali dengan PBS. Selanjutnya dilakukan inkubasi *slide* dengan antibodi primer (anti reseptor α estrogen) selama satu malam pada suhu 4°C, untuk organ uterus antibodi primer ditambah dengan 1% BSA 1:40. *Slide* untuk kontrol negatif diinkubasi

dengan *normal horse serum*. Keesokan harinya *slide* dibilas dengan PBS lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder yang telah dilabel dengan *peroxydase* untuk organ ovarium dan antibodi sekunder yang telah dilabel biotin untuk organ uterus pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah proses inkubasi selesai, *slide* dicuci kembali dengan PBS. Organ uterus ditambahkan avidin peroksidase sedangkan organ ovarium langsung dicuci dengan PBS. Untuk mendeteksi adanya ikatan antigen dan antibodi yang terbentuk selama proses pewarnaan, *slide* jaringan ditetaskan dengan larutan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) selama 3-4 menit sambil diamati perubahan warna dibawah mikroskop. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna coklat yang muncul pada jaringan. Setelah reaksi positif terjadi, *slide* dicuci dengan akuades dan dilakukan proses *counterstain* dengan Mayer's hematoksilin. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi, *clearing*, dan *mounting*. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop cahaya dan difoto dengan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan alat mikrofotografi.

Pengamatan hasil pewarnaan

Pengamatan sebaran ERα pada ovarium dan uterus dilakukan berdasarkan adanya reaksi positif antara antigen dengan antibodi. Pengamatan dilakukan terhadap pola sebaran ERα yang bereaksi positif dan intensitas warna ERα dengan kriteria skoring: negatif (-), lemah (+), sedang (++) , dan kuat (+++). Setelah diamati, selanjutnya *slide* jaringan difoto dengan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan alat foto digital.

Analisis Data

Data ekspresi dan intensitas warna ERα pada ovarium dan uterus tikus dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Ekspresi Reseptor Estrogen Alpha (ERα) pada Ovarium Tikus.

Ekspresi ERα pada bagian-bagian spesifik dari jaringan pada penelitian ini ditemukan pada inti sel. Intensitas warna ERα yang terekspresi pada setiap struktur ovarium disajikan pada Tabel 1. Bagian stroma dan korpus luteum merupakan bagian yang paling banyak ditemukan ERα, sedangkan pada sel teka, buluh darah, oosit, dan epitel germinativum relatif sedikit (Gambar 1).

Intensitas warna ERα dengan kategori kuat (+++) diamati pada ovarium tikus umur 2 bulan yang tersebar di bagian stroma dan korpus luteum. Intensitas warna ERα lemah (+) diamati pada sel teka, buluh darah, oosit, dan epitel germinativum, namun ERα negatif (-) pada sel-sel granulosa. Pada ovarium tikus umur 4 bulan, pola distribusi dan intensitas warna ERα hampir sama dengan ovarium tikus umur 2 bulan, namun pada tikus umur 4 bulan terjadi peningkatan intensitas warna ERα yang terekspresi pada sel-sel teka, buluh darah, dan oosit dengan kategori sedang (++) .

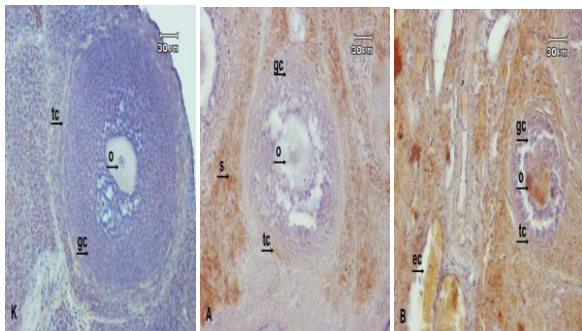
Tabel 1. Perkembangan dan pola sebaran ERα pada ovarium tikus putih.

Umur Tikus (bulan)	Struktur Ovarium						
	Stroma	Korpus luteum	Sel Teka	Buluh darah	Oosit	Epitel germinativum	Sel Granulosa
2	+++	+++	+	+	+	+	-
4	+++	+++	++	++	++	+	-
6	++	++	++	+	+	+	-
>12	++	++	+	+	+	+	-

Kriteria intensitas warna ERα pada ovarium tikus putih: negatif (-); lemah (+); sedang (++) ; kuat(+++).

Perubahan ekspresi intensitas warna ER α yang mengalami penurunan (++) pada ovarium tikus umur 6 bulan dan >12 bulan ditemukan khususnya di bagian stroma, dan korpus luteum. Pada oosit, epitel germinativum, dan sel-sel endotel buluh darah terdistribusi dengan kategori lemah (+/1-60 ER α), dan tidak terekspresi (-) pada sel granulosa.

Ekspresi ER α yang diamati pada ovarium tikus umur 2, 4, 6, dan >12 bulan menunjukkan adanya perbedaan intensitas warna. Perbedaan tersebut diduga berkaitan dengan kondisi fisiologis tikus yang telah memasuki masa pubertas dan puncak perkembangan organ reproduksi. Hafez dkk. (2000) menyatakan bahwa tikus telah memasuki masa pubertas pada umur 50-72 hari. Hormon estrogen akan bekerja bila berikatan dengan reseptornya (ER α dan ER β). Oleh karena itu, pada masa pubertas hingga puncak perkembangan organ reproduksi kuat ditemukan ekspresi ER α .



Gambar 1. Perkembangan dan pola sebaran ER α pada ovarium tikus putih. Jaringan ovarium yang digunakan sebagai kontrol negatif (K). Ekspresi ER α (warna coklat) pada ovarium tikus umur 2 bulan (A) dan 4 bulan (B). S= stroma, cl= korpus luteum, gc= sel granulosa, tc= sel teka, ec= sel endotel, o= oosit. Pewarnaan IHK skala garis 30 μ m (K, A, dan B).

Pada penelitian ini terbukti bahwa intensitas warna ER α kuat ditemukan pada jaringan ovarium tikus yang telah memasuki usia pubertas (2 bulan) hingga puncak

perkembangan organ reproduksi betina (6 bulan). Namun ekspresi ER α mulai berkurang pada tikus umur >12 bulan yang diduga berhubungan dengan penurunan fungsi organ-organ reproduksi tikus tersebut. Prayogha (2012) menyatakan bahwa aktivitas reproduksi pada tikus mulai menurun setelah tikus berumur 1 tahun.

Pola sebaran ER α pada ovarium tikus pada penelitian ini sesuai seperti yang dilaporkan Hiroi dkk. (1999) dan Wang dkk. (2000), bahwa sebaran ER α terdeteksi positif pada stroma, sel teka, sel granulosa, epitel germinativum, dan oosit. Pada penelitian ini, ER α tidak ditemukan pada sel-sel granulosa, sama seperti yang dilaporkan oleh Saunders dkk. (1997). Namun demikian, beberapa peneliti berhasil mendeteksi ER α pada sel granulosa dan sel teka mencit (Orimo dkk., 1995) dan tikus (Bayers dkk., 1997).

Pada fase estrus, ER α mengalami peningkatan (Wang dkk., 2000). Menurut Priedkalns dan Leiser (2006), pada fase ini berlangsung proses ovulasi yang didahului dengan stimulasi LH yang mengakibatkan peningkatan sintesis hormon estrogen dan sedikit androgen oleh sel-sel teka folikel ovarium, namun konsentrasi hormon estrogen tersebut menurun di akhir fase estrus.

Perkembangan Ekspresi Reseptor Estrogen Alpha ir-ER α pada Uterus Tikus

Ekspresi ER α pada uterus tikus diamati pada endometrium, kelenjar uterus, miometrium, dan epitel luminal (Gambar 2). Walaupun ER α terekspresi pada struktur yang sama pada seluruh uterus tetapi intensitas warna ER α tersebut berbeda pada setiap umur tikus (Tabel 2).

Pada uterus tikus putih umur 2 bulan, ekspresi ER α di bagian stroma dan epitel luminal ditemukan dengan intensitas warna

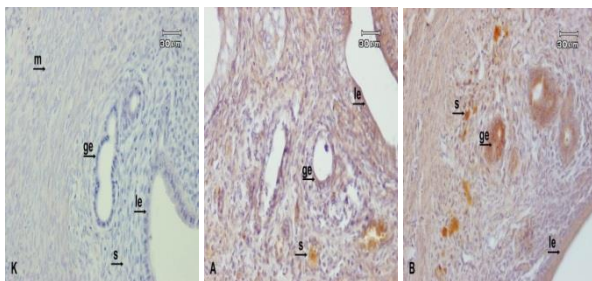
lemah (+), dan sedang (++) pada miometrium sedangkan pada kelenjar uterus tidak ditemukan reseptor tersebut. Ekspresi ER α terdeteksi dengan intensitas warna sedang (++) pada bagian stroma, miometrium, dan epitel uterus tikus umur 4 bulan sedangkan pada kelenjar uterus intensitas warnanya lemah (+).

Tabel 3. Perkembangan dan pola sebaran ER α pada uterus tikus.

Umur Tikus (bulan)	Uterus			
	Stroma	Kelenjar uterus	Miometrium	Epitel luminal
2	+	-	++	+
4	++	+	++	++
6	+++	++	+++	+++
>12	+++	++	++	++

Kriteria intensitas warna ER α pada uterus tikus putih: negatif (-); lemah (+); sedang (++); kuat(+++).

Pada bagian stroma, miometrium dan epitel uterus tikus umur 6 bulan, ER α terekspresi dengan intensitas warna kuat (+++) dan sedang (++) pada kelenjar uterus. Selanjutnya pada tikus umur >12 bulan, intensitas warna ER α kategori kuat (+++) pada bagian stroma dan sedang (++) pada epitel, kelenjer uterus, dan miometrium.



Gambar 2. Perkembangan dan pola sebaran sel-sel ir-ER α uterus tikus putih. Jaringan uterus yang digunakan sebagai kontrol

negatif (K), sel-sel ir-ER α (warna coklat) pada uterus tikus umur 6 bulan (A) dan >12 bulan (B). s= stroma, ge= kelenjar uterin, m= miometrium, le= epitel. Pewarnaan IHK skala garis 30 μ m (K, A,dan B).

Tikus umur 4 dan 6 bulan menunjukkan perbedaan perkembangan dan pola sebaran, hal ini diduga berkaitan dengan fase estrus yang dialami oleh kedua kelompok umur tikus tersebut. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ER α pada uterus saat fase proestrus intensitasnya lebih kuat dibandingkan pada fase estrus, sedangkan pada masa metestrus intensitasnya menurun (Wang dkk., 2000), dan uterus monyet selama siklus menstruasi (Koji dan Brenner, 1993). Beberapa hasil penelitian telah membuktikan bahwa banyak terekspresi ER α pada uterus tikus (Saunders dkk., 1997; Wang dkk., 2000), dan lapisan endometrium monyet (Kuiper dkk., 1997).

Peningkatan hormon estrogen yang terjadi dari fase proestrus sampai estrus menstimulasi sekresi hormon progesteron, sehingga menyebabkan pertumbuhan serta percabangan kelenjar, sedangkan kenaikan progesteron setelah fase estrus menyebabkan peningkatan aktivitas sekresi kelenjar endometrium, perkembangan struktur kelenjar sepanjang siklus estrus berjalan seiring dengan pertambahan tebal endometrium uterus (Burkitt dkk., 1999). Perubahan struktur histologis uterus disebabkan karena pada lapisan penyusun dinding uterus memiliki reseptor estrogen, sehingga perubahan struktur lapisan tersebut berjalan seiring dengan perubahan kandungan hormon tersebut sepanjang siklus estrus (Hillisch dkk., 2004).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perkembangan dan pola distribusi ER α pada ovarium dan uterus

berbeda pada setiap tingkatan umur, hal ini dipengaruhi oleh tahapan pertumbuhan dan perkembangan organ reproduksi betina serta siklus reproduksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bayers, M., C.G. Kuiper, J.A. Gustafsson, and O.K. Park-Sarge. 1997. Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down regulation by gonadotropin. **Mol. Endocrinol.** 11: 172-182.
- Brown, R.E. 1994. **An Introduction To Neuroendocrinology.** Cambridge University Press, United Kingdom.
- Burkitt, H.G., B. Young and J.W. Heath. 1999. **Wheaters Functional Histology. A Text and Colour Atlas.** 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburg.
- Gadjahnata, K.H.O. 1989. **Biologi Kedokteran I.** Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Pendidikan tinggi, Pusat antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor, IPB Press, Bogor.
- Guyton, A.C. dan J.E. Hall. 2007. **Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.** 11th ed. Irawati dkk, penerjemah. EGC, Jakarta.
- Hafez, E.S.E., M.R Jainudeen, dan Y. Rosnina. 2000. Hormones, Growth Factors And Reproductions. Di dalam: **Reproduction in Farm Animals.** 3th ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Hillisch, A. O. Peter, D. Kosemund, G. Muller, A. Waller, B. Schneider, G. Reddersen, W. Eiger and K.H. Fritzscheier. 2004. Dissecting Physiological Roles on Estrogen and Potent Selective Ligands from Structure Based Design. <http://www.ehpoline.org/realfiles/2004/6848/6848.html>. 15 Mei 2016.
- Hiroi, H., S. Inoue, T. Watanabe, W. Goto, A. Orimo, M. Momoeda, O. Tsutsumi, Y. Taketani, and M. Muramatsu. 1999. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. **J. Mol. endocrinol.** 22: 37-44.
- Hsu, S., L. Raine, and F. H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem Cytochem.** 92:577-580.
- Ibanez, C., and E.E Baulieu. 2005. Mechanisms of Action of Sex Steroid Hormones and Their Analog. Lauritzen C dan Studd. Di dalam: **Current Management of The Menopause.** Taylor & Francis, London
- Key, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methode. Di dalam **Education Guide: Immunohistochemical Staining Methode.** 5th ed. George L Kumar dan Lars Rudbeck. Dako, California.
- Kiernan, J.A. 1990. **Histological and Histochemical Method: Theory and Practice.** 2nd ed. Pergamon Press, New York.
- Koji, T., and R.M. Brenner. 1993. Localization of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rhesus monkey uterus by nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotides. **Endocrinol.** 132: 382-392.
- Kuiper, G.G.J.M., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggbland, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript distribution of estrogen receptors α and β . **Endocrinol.** 138: 863-870.
- Murray, R.K., D.K. Granner, dan V.W. Rodwel. 2009. **Biokimia Harper.** Edisi ke-27. (Diterjemahkan oleh: Brahman U). EGC, Jakarta.
- Orimo, S. Inoue, K. Ikeda, S. Noji, dan M. Muramatsu. 1995. Molecular cloning, structure, and expression of mouse estrogen-responsive finger protein Efp. **J. Biol. Chemistry.** 270: 24406-24413.
- Pratoko, D.K. 2012. Molecular docking turunan kalkon terhadap reseptor estrogen β ($\text{er-}\beta$) sebagai antikanker payudara. **J. Kim.** 1(1): 1-10.
- Prayogha, P.K.G. 2012. Profil Hormon Ovari Sepanjang Siklus Estrus Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Menggunakan *Fourrier Transform Infrared* (FTIR). **Skripsi.** Program Studi Biologi, UI, Jakarta.
- Priedkalns, J. dan R. Leiser. 2006. Female Reproductive System. Dellmann, H.D. In **Textbook of Veterinary Histology.** 5th Ed. Blackwell Publishing, USA.
- Rai, L.R. and U. Jeswar. 2010. Immunolocalization of estrogen receptor alpha in adult female rat hippocampus. **Int. J. Morphol.** 28(2): 483-487.
- Saunders, P.T.K., S.M. Maguire, J. Gaughan, and M.R Millar. 1997. Ekspresion of oestrogen receptor β (ER β) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. **J. Endocrinol.** 154: 13-16.
- Taylor, C.R. 2006. Techniques Of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. In Dabbs D (Ed). **Diagnostic Immunohistochemistry.** 2nd ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Vector Lab. 2014. Instruction For Immunohistochemical Staining Using Goat Primary Antibodies. <http://www.vectorlabs.com>. 27 November 2015.
- Wang, H., H. Eriksson, L. Sahlin. 2000. Estrogen receptors α dan β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. **Biol. Reprod.** 63: 1331-1340.