

PENGARUH EKSTRAK JAHE MERAH (*Zingiber officinale var. Rubrum*) TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM TIKUS PUTIH STRAIN WISTAR BETINA (*Rattus norvegicus*)

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

Firzani Fatma Septanti

NIM 145070600111026

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK JAHE MERAH (*Zingiber officinale var. Rubrum*)
TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM TIKUS PUTIH STRAIN WISTAR
BETINA (*Rattus norvegicus*)

Oleh:

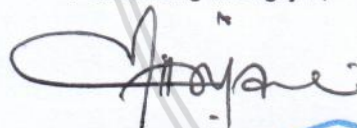
FIRZANI FATMA SEPTANTI
NIM 145070600111026

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal : 19 April 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

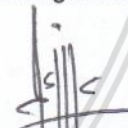
Dr.dr. Endang Sri Wahyuni, MS
NIP. 195210081980032002

Pembimbing-I/Penguji-II,



dr. Elly Mayangsari, M.Biomed
NIP. 198405162009122005

Pembimbing-II/ Penguji-III,



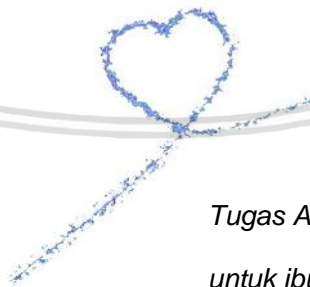
Lilik Indahwati, SST., M.Keb
NIP. 2016118303232001

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan,



Linda Ratna Wati, SST., M.Kes
NIP. 198409132014042001





*Tugas Akhir ini kupersembahkan
untuk ibunda dan ayahanda tercinta
yang telah memperjuangkan segala
yang terbaik untukku dan yang tak
kenal lelah dalam memberikan cinta
kasihnya kepadaku*



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Firzani Fatma Septanti

NIM : 145070600111026

Program Studi : Program Studi S1 Kebidanan

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 12 April 2018

Yang membuat pernyataan,

Firzani Fatma Septanti

NIM. 145070600111026



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat limpahan Rahmat dan Karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul Pengaruh Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* Var. *Rubrum*) terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus Putih Strain Wistar Betina (*Rattus norvegicus*). Penyusunan tugas akhir ini adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana kebidanan.

Topik yang penulis ambil dalam penyusunan tugas akhir ini adalah mengenai infertilitas yang mengancam masa depan sebuah pasangan karena sulitnya memiliki keturunan yang dapat disebabkan oleh kegagalan ovulasi. Kegagalan ovulasi ini dapat disebabkan oleh obat antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa jahe merah yang mengandung zat antiinflamasi dapat menghambat maturasi folikel dan ovulasi yang merupakan salah satu penyebab dari infertilitas tersebut.

Proses penyusunan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah mengizinkan penulis untuk mengerjakan Tugas Akhir dan senantiasa memberikan kesehatan serta kelancaran dalam proses pengerjaan Tugas Akhir ini.
2. Ibunda Nur Zahroh dan Ayahanda Karno Widodo yang telah memberikan kasih sayang yang teramat besar kepada penulis sehingga penulis mempunyai semangat yang lebih dalam proses penyusunan Tugas Akhir ini.
3. dr. Elly Mayangsari, M.Biomed sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan ilmunya dan mengarahkan penulis dalam mencari referensi mengenai imunologi dasar, inflamasi dalam reproduksi, metode yang digunakan untuk menunjang keberhasilan penelitian, dan juga senantiasa memberikan semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Ibu Lilik Indahwati, SST., M.Keb sebagai pembimbing kedua yang telah membantu penulis untuk memperdalam ilmu mengenai hubungan inflamasi terhadap sistem reproduksi, membantu menyesuaikan metode dengan teori sehingga sangat menunjang keberhasilan penelitian, dan senantiasa

- memberi semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
5. Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS sebagai penguji utama Tugas Akhir ini yang telah banyak memberikan masukan untuk Tugas Akhir penulis.
 6. Ibu Linda Ratna Wati, SST., M.Kes sebagai Ketua Program Studi S1 Kebidanan yang telah membimbing penulis dalam menuntut ilmu di Program Studi S1 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
 7. dr. Hermawan Wibisono SPOG(K) selaku Ketua Jurusan Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan ilmunya dan memberikan kesempatan penulis untuk menimba ilmu di jurusan kebidanan.
 8. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
 9. Seluruh anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu jalannya proses administrasi Tugas Akhir sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
 10. Tim penelitian "Skripsi Barokah" yaitu Anggun Pitaloka dan Gheza Dearysma Kinanti Putri yang senantiasa bekerja keras bersama penulis dalam melakukan penelitian dan menyelesaikan Tugas Akhir.
 11. Tim Laboratorium Farmakologi dan Tim Laboratorium Patologi Anatomi yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian di kedua laboratorium tersebut dan selalu membantu penulis dalam melakukan penelitian.
 12. Adikku Fatih Yuniar Rifansyah dan Keluarga Besar Haji Shofwan yang turut mendoakan dan memberikan semangat kepada penulis selama proses penyusunan Tugas Akhir.
 13. Sahabatku Azalia dan Qurrotul A'yun dan teman-temanku Nuha 'Uliya Dzakiyah, Kiky Supriatna Putri, dan Dessy Nur Safitri yang telah menemani, memberi semangat, dan memberikan saran dan masukan baik terkait konten Tugas Akhir maupun masalah yang dihadapi penulis dalam proses penyusunan Tugas Akhir.
 14. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis sangat menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu penulis memohon saran dan masukannya untuk membuat karya ilmiah ini menjadi lebih baik dan lebih bermanfaat. Semoga, Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua yang membutuhkan.

Malang, 19 April 2018

Penulis



ABSTRAK

Septanti, Firzani Fatma. 2018. ***Pengaruh Ekstrak Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubrum) terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus Putih Strain Wistar Betina (Rattus norvegicus)***. Tugas Akhir, Program Studi Kebidanan, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Elly Mayangsari, M. Biomed (2) Lilik Indahwati, SST., M. Keb.

Jahe (*Zingiber officinale*) adalah tumbuhan yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai alternatif pengobatan atau pemeliharaan kesehatan. Jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) memiliki kandungan minyak atsiri paling banyak dibandingkan dengan jenis jahe yang lain. Komponen fenol pada oleoresin jahe merah dan flavonoid memiliki efek antiinflamasi dalam menghambat keluarnya enzim siklooksigenase dan lipoksigenase. Peran prostaglandin sebagai mediator inflamasi sangat dominan dalam proses maturasi folikel ovarium dan ovulasi sehingga diperkirakan kandungan bioaktif dari jahe merah dapat menginduksi terjadinya infertilitas. Penelitian ini mengidentifikasi pengaruh ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus strain wistar. Sampel pada penelitian ini adalah tikus strain wistar yang mempunyai siklus estrus normal. Tikus-tikus ini dibagi menjadi 4 kelompok sampel, yaitu kelompok kontrol (tanpa pemberian ekstrak jahe merah), dan 3 kelompok perlakuan ekstrak jahe merah yang terdiri dari (I) 0,3 gr/kgBB, (II) 0,6 gr/kg BB, dan (III) 1,2 gr/kgBB. Perlakuan diberikan selama 3 siklus estrus secara oral dua kali sehari, yaitu pukul 10.00 dan 14.00. Hasil uji *One-Way ANOVA* menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah folikel ovarium kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p = 0,000$). Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak jahe merah dapat berpengaruh terhadap penurunan jumlah folikel ovarium tikus strain wistar mulai dari dosis 0,3 gr/kgBB sehingga dosis tersebut adalah dosis optimal dalam memberikan efek tersebut.

Kata kunci: ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*), antiinflamasi, infertilitas, ovulasi, jumlah folikel ovarium

ABSTRACT

Septanti, Firzani Fatma. 2018. **The Influence of Red Ginger Extract (*Zingiber officinale var. Rubrum*) to Number of Ovarian Follicle of White Female Strain Wistar Rat (*Rattus norvegicus*)**. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Elly Mayangsari, M. Biomed (2) Lilik Indahwati, SST., M. Keb.

Ginger (*Zingiber officinale*) is a plant that's most used by human as the alternative way for medical treatment or maintenance health. Red ginger (*Zingiber officinale var. Rubrum*) has more essential oil deposits than another variant of ginger. The fenol of red ginger's oleoresin and flavonoid component have anti-inflammatory effect to inhibit the rise of cyclooxygenase and lipooxygenase enzymes. The role of prostaglandin as inflammatory mediator is strongly dominant in maturation and ovulation process in ovary, so it can be predicted that bioactive agent in red ginger can induce infertility. This study was identifying the effect of red ginger extract to number of ovarian follicle of strain wistar rat. Sample in this study was strain wistar rat that have normal estrous cycle. These rats divided into four sample groups, there were control group (without exposure of red ginger extract), and three groups of red ginger extract exposurement, there are (I) 0,3 gr/kgBW, (II) 0,6 gr/kg BW, and (III) 1,2 gr/kgBW. This exposure was given for three estrous cycles twice a day at 10 a.m. and 2 p.m. The result of One-Way ANOVA test show that there was a significance difference in the number of ovarian follicle among exposure group and control group ($p = 0,000$). This study can be concluded that red ginger extract can give the effect to reducing number of ovarian follicle in strain wistar rat start from 0,3 gr/kgBW dose, so that dose is the optimal dose to giving that effect.

Keywords: red ginger extract (*Zingiber officinale var. Rubrum*), anti-inflammatory, infertility, ovulation, number of ovarian follicle

DAFTAR ISI

Judul-----	i
Halaman Pengesahan-----	ii
Halaman Peruntukan -----	iii
Pernyataan Keaslian Tulisan -----	iv
Kata Pengantar -----	v
Abstrak-----	viii
Abstract -----	ix
Daftar Isi -----	x
Daftar Gambar -----	xiv
Daftar Tabel-----	xvi
Daftar Lampiran-----	xvii
Daftar Singkatan-----	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang -----	1
1.2 Rumusan Masalah-----	4
1.3 Tujuan Penelitian -----	4
1.3.1 Tujuan Umum -----	4
1.3.2 Tujuan Khusus -----	4
1.4 Manfaat Penelitian-----	5
1.4.1 Manfaat Akademik -----	5
1.4.2 Manfaat Praktis -----	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubrum) -----	6
2.1.1 Taksonomi -----	6
2.1.2 Morfologi Jahe Merah -----	7
2.1.3 Kandungan Jahe Merah -----	7
2.1.4 Efek Farmakologi Berbagai Kandungan Jahe Merah-----	9
2.1.4.1 Gingerol dan Shogaol -----	10
2.1.4.2 Flavonoid -----	11
2.2 Inflamasi -----	12

2.2.1 Sel-sel Inflamasi-----	13
2.2.2 Mediator Inflamasi-----	15
2.2.2.1 Mediator <i>performed</i> -----	16
2.2.2.2 Mediator asal lipid-----	16
2.2.3 Perbedaan Enzim Siklooksigenase-1 dan Siklooksigenase-2-----	18
2.3 Histologi Ovarium dan Perkembangan Folikel dalam Ovarium-----	21
2.3.1 Struktur dan Jaringan Ovarium-----	21
2.3.2 Produksi dan Maturasi Gamet di Ovarium-----	24
2.3.2.1 Pembelahan Mitosis dari Primordial Germ Cells-----	24
2.3.2.2 Folikel Primordial dan Folikel Primer-----	25
2.3.2.3 Folikel Sekunder-----	26
2.3.2.4 Folikel Tersier (<i>Graafian Follicle</i>)-----	27
2.3.2.5 Ovulasi-----	28
2.3.2.6 Korpus Luteum-----	29
2.3.2.7 Korpus Albikan-----	31
2.3.2.8 Folikel Atresia-----	31
2.4 Hubungan Inflamasi dan Ovulasi-----	33
2.4.1 Masa Menstruasi-----	33
2.4.2 Fase Folikuler-----	35
2.4.3 Fase Luteal-----	39
2.5 Gambaran Folikel Anovulatoir Akibat Paparan Antiinflamasi-----	41
2.5.1 <i>Luteinized Unruptured Follicle</i> (LUF)-----	41
2.5.2 <i>Cumulus-Oocyte Complex</i> (COC)-----	42
2.6 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Strain Wistar-----	44
2.7 Siklus Estrus Tikus-----	45
2.8 Anatomi Reproduksi Tikus-----	48
2.8.1 Makroanatomi Reproduksi Tikus-----	48
2.8.2 Mikroanatomi Reproduksi Tikus dan Perkembangan Ovarium-----	49

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep-----	52
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep-----	53

3.3 Hipotesis Penelitian	55
--------------------------------	----

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	56
4.2 Populasi dan Sampel	56
4.2.1 Identifikasi dan Jumlah Sampel.....	56
4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	58
4.3 Variabel Penelitian.....	59
4.3.1 Variabel Bebas.....	59
4.3.2 Variabel Terikat	59
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	59
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	59
4.5.1 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Jahe Merah	59
4.5.2 Bahan dan Alat Pengamatan Siklus Estrus Tikus	60
4.5.3 Bahan dan Alat Pengambilan Organ	61
4.5.4 Bahan dan Alat Pengamatan Jumlah Folikel Ovarium Tikus.....	61
4.5.4.1 Bahan dan Alat Pembuatan Preparat Histologi Ovarium.....	61
4.5.4.2 Bahan dan Alat Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium.....	61
4.6 Definisi Operasional.....	62
4.7 Prosedur Penelitian	63
4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba	63
4.7.2 Pengamatan Siklus Estrus Tikus	63
4.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba	64
4.7.4 Pemberian Tanda pada Hewan Coba	65
4.7.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Jahe Merah.....	65
4.7.5.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Jahe Merah.....	65
4.7.5.2 Pemberian Ekstrak Jahe Merah.....	67
4.7.6 Prosedur Pengambilan Organ.....	67
4.7.7 Pembuatan Preparat Histologi Ovarium	68
4.7.8 Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium.....	70
4.8 Alur Penelitian	72

4.9 Analisis Data----- 73

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Pengamatan Mikroskopis Siklus Estrus Tikus Strain

 Wistar Betina----- 75

5.2 Gambaran Mikroskopis Histologi Ovarium Tikus----- 76

5.3 Analisis Data Hasil Penelitian----- 81

 5.3.1 Analisis Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas----- 81

 5.3.2 Pengaruh Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale*
 var. Rubrum) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus
 Putih Strain Wistar Betina (*Rattus norvegicus*)----- 82

BAB 6 PEMBAHASAN ----- 89

BAB 7 PENUTUP

 7.1 Kesimpulan----- 97

 7.2 Saran ----- 97

Daftar Pustaka ----- 99

Lampiran----- 103



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Rimpang Jahe Merah ----- 7

Gambar 2.2 Peran Flavonoid sebagai Antiinflamasi dan
Antioksidan----- 12

Gambar 2.3 Metabolisme Asam Arakidonat ----- 18

Gambar 2.4 COX-1 dan COX-2 dalam Produksi Prostaglandin----- 21

Gambar 2.5 Ovarium ----- 21

Gambar 2.6 Folikel Primer----- 26

Gambar 2.7 Folikel Sekunder ----- 27

Gambar 2.8 Folikel Tersier (Folikel *de Graaf*) ----- 28

Gambar 2.9 Oosit----- 29

Gambar 2.10 Korpus Luteum----- 30

Gambar 2.11 Korpus Albikan----- 31

Gambar 2.12 Folikel Atresia ----- 33

Gambar 2.13 Proses Inflamasi dalam Siklus Menstruasi----- 34

Gambar 2.14 Peran Eikosanoid yang Mungkin pada Fungsi
Ovarium ----- 36

Gambar 2.15 *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) ----- 42

Gambar 2.16 *Cumulus-Oocyte Complex* (COC)----- 44

Gambar 2.17 Deteksi *Swab* Vagina pada Siklus Estrus Tikus ----- 47

Gambar 2.18 Manifestasi Makroanatomi pada Siklus Estrus Tikus
C57BL/6-129 ----- 49

Gambar 2.19 Makroskopi dan Mikroskopi Uterus selama Siklus
Estrus----- 49

Gambar 2.20 Penampang Mikroskopi Ovarium Tikus yang Diberi
Hematoxylin-Eosin selama Siklus Estrus----- 51

Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Siklus Estrus Tikus----- 76

Gambar 5.2 Gambaran Mikroskopis Ovarium Kanan Tikus Strain
Wistar----- 77

Gambar 5.3 Gambaran Mikroskopis Ovarium Kiri Tikus Strain
Wistar----- 78

Gambar 5.4 Gambaran Mikroskopis *Luteinized Unruptured Follicle*
(LUF) dan *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) pada



Ovarium Kelompok Perlakuan-----	80
Gambar 5.5 Grafik Rata-Rata Jumlah Folikel Ovarium Kanan (a) dan Kiri (b) pada Setiap Kelompok (buah)-----	83
Gambar 5.6 Grafik Uji Regresi <i>Linear</i> Folikel Ovarium Kanan (a) dan Kiri (b)-----	87



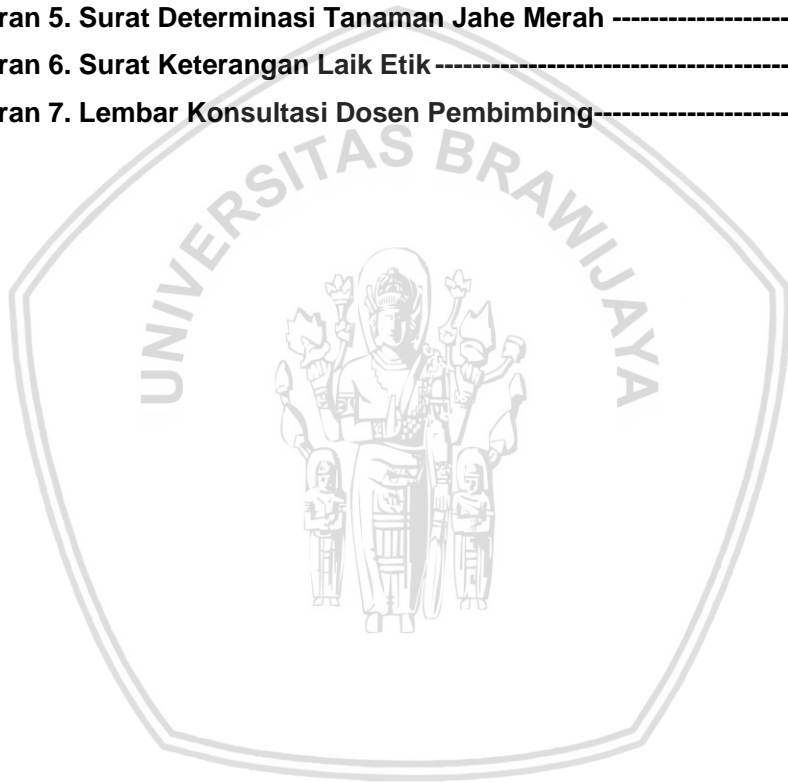
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Struktur, Distribusi, dan Regulasi dari COX-1 dan COX-2----	20
Tabel 2.2 Sitologi Vagina dan Perilaku selama Siklus Estrus -----	47
Tabel 4.1 Definisi Operasional pada Penelitian berdasarkan Satuan dan Skala-----	62
Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Folikel Ovarium (buah)-----	82

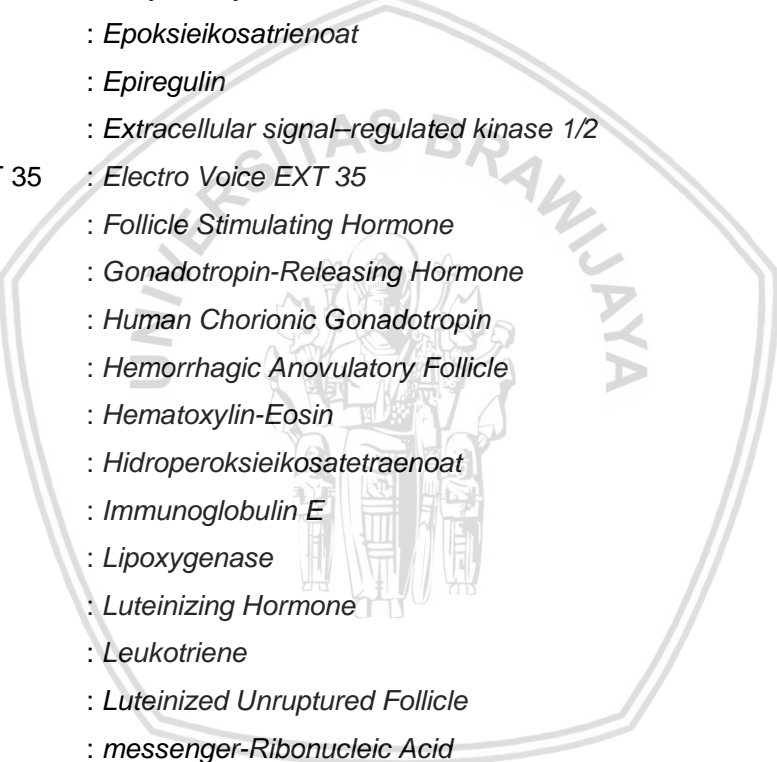


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan----- 103
 Lampiran 2. Gambar Jenis-Jenis Folikel Ovarium pada Preparat
 Histologis Ovarium----- 107
 Lampiran 3. Data Jumlah Folikel----- 108
 Lampiran 4. Hasil Analisis Statistik----- 109
 Lampiran 5. Surat Determinasi Tanaman Jahe Merah ----- 116
 Lampiran 6. Surat Keterangan Laik Etik----- 117
 Lampiran 7. Lembar Konsultasi Dosen Pembimbing----- 118



DAFTAR SINGKATAN



AA	: <i>Arachidonic Acid</i>
AREG	: <i>Amphiregulin</i>
C57BL/6	: <i>C57 Black 6</i>
COC	: <i>Cumulus-Oocyte Complex</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
EASC	: <i>Enzymically Active Stromal Cells</i>
EETs	: <i>Epoksieikosatrienoat</i>
EREG	: <i>Epiregulin</i>
ERK1/2	: <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
EV EXT 35	: <i>Electro Voice EXT 35</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
hCG	: <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HAF	: <i>Hemorrhagic Anovulatory Follicle</i>
HE	: <i>Hematoxylin-Eosin</i>
HETE	: <i>Hidroperoksieikosatetraenoat</i>
IgE	: <i>Immunoglobulin E</i>
LOX	: <i>Lipoxygenase</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LT	: <i>Leukotriene</i>
LUF	: <i>Luteinized Unruptured Follicle</i>
mRNA	: <i>messenger-Ribonucleic Acid</i>
NaCl	: <i>Sodium Chloride</i>
NGF	: <i>Nerve Growth Factor</i>
NP-Y	: <i>Neuropeptide-Y</i>
NSAID	: <i>Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
PG	: <i>Prostaglandin</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
SRS-A	: <i>Slow Reacting Substances of Anaphylaxis</i>



TX : *Thromboxane*
WHO : *World Health Organization*



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas didefinisikan sebagai ketidakmampuan seorang wanita atau pria untuk memiliki keturunan setelah berhubungan seksual selama 1 tahun dengan frekuensi minimal 4 kali seminggu tanpa menggunakan alat kontrasepsi (Stright, 2005). Masyarakat pada umumnya biasa menyebut infertilitas ini sebagai kemandulan. Masalah infertilitas ini adalah masalah yang cukup serius dan mengancam masa depan sebuah pasangan karena sulitnya memiliki keturunan. Sekitar 10 sampai 15% penduduk Indonesia mengalami infertilitas, artinya, 1 dari 10 orang berpotensi mengalami infertilitas. Kejadian infertilitas di Indonesia cenderung meningkat selama 40 tahun terakhir (Syafrudin dan Hamidah, 2009). Sumber penyebab infertilitas dapat berasal dari pria maupun wanita dengan prevalensi yang sama yaitu sebesar 30% pada pria dan 30% pada wanita sedangkan pada keduanya adalah 30% dan sisanya tidak teridentifikasi (Stright, 2005). Penyebab utama infertilitas pada wanita terletak pada tuba falopi dan ovarium yaitu sebesar 40-50%. Pada ovarium, infertilitas disebabkan karena kegagalan ovulasi (Syafrudin dan Hamidah, 2009). Kegagalan ovulasi dapat terjadi karena proses ovulasi yang dihambat oleh obat antiinflamasi dosis tinggi sebelum terjadinya kenaikan LH (*Luteinizing Hormone*) (Akpantah, *et al.*, 2005). Salah satu tumbuhan yang mengandung banyak zat antiinflamasi yaitu jahe (Purwanto, 2013).

Jahe (*Zingiber officinale*) adalah tumbuhan yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai alternatif pengobatan atau pemeliharaan kesehatan (Wasito,

2011). Umumnya, jahe digunakan sebagai obat batuk, peningkat nafsu makan, mengobati perut kembung, gatal, sakit kepala, dan juga digunakan untuk melancarkan ASI (Redaksi Agromedia, 2008). Produksi tumbuhannya pun sangat melimpah. Menurut Badan Pusat Statistik, tahun 2012 produksi jahe di Indonesia merupakan produksi tertinggi di antara tumbuhan obat jenis lainnya yaitu 114.537.658 kg dengan luas panen 56.288.948 m². Ada 3 jenis jahe, yaitu jahe gajah, jahe emprit, dan jahe merah yang memiliki perbedaan kandungan minyak atsiri. Jahe merah memiliki kandungan minyak atsiri paling tinggi yaitu 2,58-3,90% sehingga masyarakat sering menggunakannya sebagai obat-obatan (Hidayati *et al.*, 2015).

Bahan aktif utama yang terkandung dalam jahe merah yaitu komponen oleoresin, minyak atsiri, dan flavonoid (Sari *et al.*, 2013). Komponen fenol pada oleoresin dan flavonoid memiliki efek antiinflamasi dalam menghambat keluarnya enzim siklooksigenase dan lipoksigenase (Purwanto, 2013). Gingerol dan shogaol termasuk dalam komponen utama pada oleoresin jahe merah (Rukmana, 2004). Kedua komponen ini dapat menghambat metabolisme asam arakidonat secara *in vitro* dengan cara menghambat enzim siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase (LOX) yang merupakan enzim untuk membentuk eikosanoid yaitu prostaglandin dan leukotrien (Bone and Mills, 2013). Eikosanoid ini penting sebagai mediator dalam proses inflamasi, yaitu dengan meningkatkan permeabilitas dan dilatasi pembuluh darah, menginduksi kemotaksis neutrofil, dan menginduksi kontraksi otot polos (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Eikosanoid juga berperan penting dalam reproduksi yaitu kontraksi otot polos (pada menstruasi dan persalinan), modulasi dari sistem imun (pada implantasi dan kehamilan), reaksi inflamasi fisiologis seperti meningkatkan aliran

darah, meningkatkan permeabilitas vaskular, mengaktifasi enzim proteolitik (pada ovulasi, pematangan serviks, dan persalinan), dan regulasi pembuluh darah. Fase folikuler yaitu ketika terjadi proses perkembangan folikel sampai saat ovulasi merupakan masa yang tidak lepas dari peran LH (*Luteinizing Hormone*) dan eikosanoid. Setiap kenaikan LH akan memicu peningkatan COX-2 untuk meningkatkan metabolisme asam arakidonat yang akan menghasilkan prostaglandin (Marks *and* Fürstenberger, 1999). Asam arakidonat juga dimetabolisme melalui jalur lipoksigease yang akan menghasilkan leukotrien (Baratawijaya dan Rengganis, 2010). Prostaglandin dan leukotrien tersebut diproduksi untuk proses maturasi folikel dan ovulasi. (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Peran prostaglandin sangat dominan dalam proses maturasi folikel dan ovulasi yaitu dengan cara menginduksi reaksi inflamasi akut untuk pematangan oosit, meningkatkan aliran darah lokal dan permeabilitas vaskular, menyebabkan edema lokal yang mendahului ovulasi, menginduksi proteolisis, serta berperan dalam proses kolagenolisis (Marks *and* Fürstenberger, 1999). Kandungan dalam jahe merah yaitu flavonoid, dan komponen oleoresin yang terdiri dari gingerol, shogaol, dan resin dapat menghambat biosintesis prostaglandin dengan cara menghambat aktivitas COX dan LOX sehingga diperkirakan jahe merah dapat menghambat maturasi folikel dan ovulasi (Purwanto, 2013; Bone *and* Mills, 2013). Jika perkembangan folikel dan ovulasi terhambat, maka dapat menyebabkan infertilitas pada seorang wanita.

Sejauh ini belum ada penelitian mengenai pengaruh ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel dengan prinsip antiinflamasi. Peneliti melakukan penelitian ini menggunakan tikus putih strain wistar betina karena tikus ini

mempunyai kapasitas reproduksi yang tinggi, waktu reproduksi yang pendek, mudah dirawat dan dikondisikan, serta mempunyai kesamaan pada seluruh organ dengan manusia yang fungsinya serupa (Bogdanske *et al.*, 2010). Dengan keterkaitan dari semua hal yang telah dipaparkan diatas, peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus strain wistar betina.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu “Bagaimana pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus putih strain wistar betina (*Rattus norvegicus*)?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengidentifikasi pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus putih strain wistar betina.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi jumlah folikel pada ovarium tikus putih strain wistar betina (*Rattus norvegicus*) setelah dilakukan pemberian ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*)

2. Mengidentifikasi dosis optimal ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) yang diberikan pada tikus strain wistar agar dapat memberikan efek infertilitas dengan menurunkan jumlah folikel ovarium.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Memberikan pengetahuan ilmiah untuk penelitian lanjutan tentang pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus putih strain wistar betina.
2. Meningkatkan ilmu pengetahuan tentang bahan herbal seperti jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) yang di dalamnya terdapat berbagai kandungan yang dapat mempengaruhi jumlah folikel pada ovarium.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan pengetahuan kepada masyarakat bahwa penggunaan jahe khususnya jahe merah pada dosis tertentu dapat menyebabkan infertilitas pada perempuan.
2. Memberikan sebuah inovasi untuk masyarakat tentang manfaat bahan alami seperti jahe merah yang mengandung berbagai senyawa yang dapat dikembangkan sebagai alat kontrasepsi pada perempuan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*)

Di Indonesia, tumbuhan bernama *Zingiber officinale* biasa disebut sebagai jahe (Achmad, 2008). Menurut *World Health Organization* (WHO), jahe menduduki peringkat tertinggi sebagai tumbuhan yang paling banyak dipakai di dunia terutama sebagai obat tradisional. Pada pengobatan tradisional di Asia, jahe memiliki banyak manfaat antara lain jahe digunakan sebagai obat kembung (karminatif), stimulan dan pelindung sistem pencernaan, mengurangi arthritis, mengurangi nyeri kepala akibat migrain, serta melancarkan buang air besar. Selain itu, jahe juga digunakan sebagai obat luar, yaitu sebagai penghangat badan, penguat syahwat, dan menyembuhkan iritasi (Lukito, 2007).

Jahe merah memiliki kandungan minyak atsiri dan oleoresin yang cukup tinggi pada rimpangnya sehingga jahe merah sangat berperan penting dalam dunia pengobatan. Tidak hanya dimanfaatkan pada daging rimpangnya, jahe merah juga dimanfaatkan bagian kulitnya yang dipanggang sampai berwarna kehitaman yang digunakan sebagai obat mencret dan disentri. Selain itu, air rebusan jahe merah bisa juga digunakan oleh perempuan untuk mengatur masa menstruasinya (Tim Lentera, 2004).

2.1.1 Taksonomi

Tanaman jahe diklasifikasikan sebagai berikut (Suprpti, 2003):

Divisi : *Pteridophyta*

Subdivisi : *Angiospermae*

Kelas : *Monocotyledoneae*
Ordo : *Scitamineae*
Famili : *Zingiberaceae*
Genus : *Zingiber*
Species : *Zingiber officinale* Rose

2.1.2 Morfologi Jahe Merah

Batang jahe merah ini mempunyai bentuk bulat dan kecil, hijau kemerahan dan sedikit keras diselubungi oleh pelepah daun, tingginya sekitar 34,18-62,28 cm. Daun jahe ini tersusun teratur, berselang-seling, lebih hijau daripada dua jenis jahe lainnya yaitu jahe gajah dan jahe emprit. Pada daun bagian atas, permukaannya lebih hijau muda dibanding bagian bawahnya. Luas daunnya mencapai 32,55-51,18 cm² dengan panjang daun 24,30-24,79 dan lebar 2,79-31,18 serta lebar tajuk 36,93-52,87 cm (Tim Lentera, 2004).



Gambar 2.1 Rimpang Jahe Merah (Tim Lentera, 2004)

2.1.3 Kandungan Jahe Merah

Kandungan senyawa kimia jahe merah secara umum terdiri dari minyak menguap (*volatile oil*), minyak tidak menguap (*nonvolatile oil*), dan pati. Minyak atsiri merupakan salah satu komponen yang termasuk minyak menguap yang dapat memberikan bau yang khas. Sedangkan kandungan minyak yang tidak

menguap disebut komponen oleoresin yang dapat memberikan rasa pedas dan pahit. Pada rimpang jahe merah, selain memiliki kandungan senyawa kimia tersebut, juga memiliki banyak kandungan yaitu *gingerol*, *6-gingerdione*, *10-dehydrogingerdione*, *1,8-cineole*, *aspartic*, *α-linolenic acid*, *arginine*, *β-sitosterol*, *chlorogenic acid*, *caprylic acid*, *capsaicin*, farnesal, *farnesene*, farnesol, dan *limonene*, serta unsur pati seperti tepung kanji, juga sedikit serat-serat resin (Hanana, 2013 dan Tim Lentera, 2004).

Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa di dalam minyak atsiri terdapat kandungan *acetates*, *caprylate*, *chavicol*, *cineol*, *citral*, *d-borneol*, *d-camphene*, *d-phellandrene*, *geraniol*, *linalool*, *methyl heptenone*, *n-nonylaldehyde*, dan *zingiberene*. Senyawa tersebut sangat penting dalam industri farmasi dan obat-obatan. Prosentase minyak atsiri dalam jahe merah ini adalah 2,58%-2,72% dari berat kering. Jika pada jenis jahe yang lain, besar kandungan minyak atsirinya masih jauh di bawah. Jahe badak (jahe besar) memiliki kandungan minyak atsiri sekitar 0,82%-1,68%, sedangkan pada jahe emprit (jahe kecil) sekitar 1,5%-3,3%. Ciri-ciri minyak atsiri pada umumnya sedikit kental dan berwarna kuning (Tim Lentera, 2004).

Banyaknya kandungan minyak atsiri dalam jahe merah ini dipengaruhi oleh umur jahe tersebut. Semakin tua umur jahe, maka semakin tinggi kandungan minyak atsiri dalam jahe tersebut. Namun, prosentase kandungan minyak atsiri akan berkurang selama dan setelah proses pembungaan sehingga tidak dianjurkan untuk melakukan panen jahe pada kondisi tersebut. Maka dari itu dapat disimpulkan bahwa umur tanaman jahe merah dan waktu panen jahe merah dapat mempengaruhi banyaknya kandungan minyak atsiri dari jahe merah (Tim Lentera, 2004).

2.1.4 Efek Farmakologi Berbagai Kandungan Jahe Merah

Jahe merah mempunyai kandungan minyak atsiri paling tinggi daripada jenis jahe yang lain sehingga masyarakat sering memanfaatkannya sebagai obat-obatan. Beberapa kandungan bahan aktif jahe merah yaitu komponen oleoresin, flavonoid, dan minyak atsiri. Minyak atsiri memiliki efek antimikrobal dengan cara menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen (Sari *et al.*, 2013). Flavonoid dan komponen fenol pada oleoresin memiliki efek antiinflamasi dengan jalan menghambat produksi enzim siklooksigenase dan lipoksigenase (Purwanto, 2013). Pada penelitian yang dilakukan oleh Hidayati *et al* (2015), ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) berpengaruh terhadap jumlah sel makrofag ulkus traumatikus mukosa mulut akibat bahan kimiawi pada *Rattus norvegicus*. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi penyembuhan ulkus traumatikus yang disebabkan oleh kandungan antiinflamasi pada jahe merah.

Selain sebagai antimikrobal dan antiinflamasi, efek farmakologis yang dimiliki oleh jahe merah antara lain merangsang ereksi, meningkatkan aktivitas kelenjar endokrin, memperlambat proses penuaan, merangsang regenerasi sel kulit, dan bahan pewangi (Hanana, 2013). Jahe merah juga berfungsi sebagai penambah stamina, penghilang nyeri otot, obat cacing, menambah kualitas penglihatan, penghilang nyeri kepala, dan sebagai obat untuk melawan gejala suatu penyakit. Efek farmakologi yang ditimbulkan oleh berbagai jenis jahe tergantung pada seberapa besar kandungan yang dimilikinya. Berdasarkan penelitian, tidak ada perbedaan antara kandungan jahe merah dan jenis jahe lainnya, namun efek farmakologi yang ditimbulkan oleh jahe merah akan lebih kuat karena kandungan gingerol, minyak atsiri, dan oleoresinnya lebih tinggi (Tim Lentera, 2004).

2.1.4.1 Gingerol dan Shogaol

Tiga komponen utama oleoresin yang terkandung dalam jahe adalah gingerol ($C_{14}H_{26}O_5$) dan shogaol ($C_{18}H_{28}O_5$) serta resin (Rukmana, 2004). Penelitian terhadap berbagai senyawa jahe yaitu [6]-gingerdion, [10]-gingerdion, [6]-dehidrogingerdion, [10]-dehidrogingerdion, dan [6]-gingerol menunjukkan efek yang kuat dalam menghambat proses biosintesis prostaglandin (Achmad, 2008). Jahe dengan berbagai komponen pedasnya dapat menghambat metabolisme asam arakidonat secara *in vitro*, yaitu dengan cara menghambat kedua enzimnya, yaitu siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase (LOX). Enzim ini merupakan enzim untuk membentuk prostaglandin dan leukotrien. Dua penghambat inhibitor yaitu inhibitor COX dan 5-LOX mungkin dapat digunakan sebagai terapi yang mempunyai efek samping sedikit daripada *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID). Gingerol lebih berpengaruh untuk menghambat biosintesis prostaglandin secara *in vitro* daripada indometasin, dan juga mampu menghambat enzim 5-LOX (Bone and Mills, 2013).

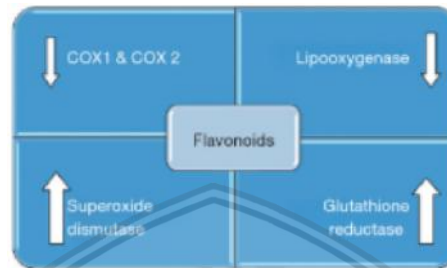
Shogaol mempunyai kemampuan untuk mencegah keluarnya prostaglandin I_2 (PGI_2) dari aorta tikus ketika diuji sebagai inhibitor dari agregasi platelet. Shogaol juga menghambat enzim COX dan LOX. 6-shogaol mempunyai berbagai efek farmakologi yaitu sebagai antialergi, antihistamin, antioksidan, antispasmodik, antiseptik, dan sedatif. Sebagai antiinflamasi, shogaol mempunyai efek antiprostaglandin, inhibitor COX, analgesik, dan antipiretik. Dosis dari 6-shogaol untuk dapat memberikan berbagai efek tersebut adalah 1,7-3,5 mg/kg intravena atau 140 mg/kg oral mus untuk analgesik, 150 mg/kg untuk antiprostaglandin IC_{50} ; 2,1 μM untuk COX-2 inhibitor IC_{50} ; dan 2,5 mg/kg untuk inhibitor COX (Duke *et al.*, 2003).

Teknologi *Lipocell*, penelitian bioteknologi dari ilmuwan asal Denmark yaitu dr. Morten S. Weidner menghasilkan teknik pemisahan senyawa gingerol dan shogaol yang terkandung dalam jahe. Gingerol hasil penelitian tersebut memperoleh paten EV EXT 35 yaitu sebagai alternatif untuk menghilangkan nyeri sendi tanpa disertai nyeri lambung. Gingerol tanpa shogaol ini mempunyai kemampuan untuk memblokir sintesis prostaglandin dan leukotrien tanpa mengganggu proteksi dari ginjal (Wibowo, 2005).

2.1.4.2 Flavonoid

Flavonoid adalah suatu zat yang terdapat pada berbagai tumbuhan atau herbal (Soeharto, 2004). Flavonoid dapat diklasifikasikan sesuai struktur molekularnya dan sesuai target lokasinya (Watson and Preedy, 2013). Flavonoid mempunyai berbagai efek farmakologi, salah satunya adalah sebagai antiinflamasi. Efek antiinflamasi yang dihasilkan oleh flavonoid adalah dengan cara menghambat sisi aktif dari peroksidase COX-1, COX-2, dan 5-LOX. Hal ini akan menghambat produksi leukotrien dan prostanoide yang terdiri dari prostaglandin dan tromboksan. Pada kenyataannya penghambatan produksi PGE₂ oleh flavonoid konsisten dengan penghambatan aktivitas dari COX. Di samping penghambatan sisi aktif dari peroksidase COX-2, ada suatu bukti yang menunjukkan bahwa flavonoid juga dapat menghambat ekspresi NF- κ B-*dependent* dari COX-2 (Atta-ur-Rahman, 2012). Beberapa flavonoid mengandung kelompok zat *O-dihydroxy* yang dapat menghambat reaksi COX selama pembentukan prostaglandin di medula renal tikus. Jenis flavonoid yaitu galangin, rutin, dan luteolin dapat menghambat lipoksigenase dan biosintesis dari prostaglandin, namun pada rutin lebih berpengaruh untuk menghambat

lipoksigenase. Selain itu, flavonoid juga memiliki efek antioksidan yaitu jenis apigenin dengan cara menurunkan stress oksidatif dan meningkatkan *glutathione reductase* dan *superoxide dismutase* (Watson and Preedy, 2013).



Gambar 2.2 Peran Flavonoid sebagai Antiinflamasi dan Antioksidan (Watson and Preedy, 2013)

Keterangan: Flavonoid meningkatkan enzim pada antioksidan dan menurunkan sintesis prostaglandin

2.2 Inflamasi

Inflamasi merupakan suatu respon lokal jaringan terhadap suatu infeksi atau cedera dan tidak lepas dari peran banyak mediatornya. Mediator inflamasi lebih banyak terlibat daripada respon imun yang didapat. Inflamasi ini merupakan proses yang fisiologis, dapat terjadi secara lokal dan sistemik, juga dapat berupa inflamasi akut maupun kronis (Baratawijaya dan Rengganis, 2010). Tahapan respons inflamasi yaitu (Asmadi, 2008):

1. Tahap 1: Respons vaskuler dan seluler.

Pada tahap pertama, saat cedera terjadi vasokonstriksi pada area tersebut selama beberapa menit diikuti dengan vasodilatasi sebagai respon dari pelepasan histamin dari jaringan yang mengalami cedera. Hiperemia terjadi di area cedera sehingga terjadi kemerahan dan menimbulkan rasa hangat. Jaringan tersebut juga akan melepaskan mediator kimia seperti prostaglandin, bradikinin, serotonin dan histamin yang meningkatkan permeabilitas vaskuler sehingga leukosit, protein, dan cairan masuk ke interstitiel dan menimbulkan edema.

Cairan yang menumpuk di interstitiel menyebabkan penekanan ujung saraf serta mediator kimia yang menyebabkan iritasi sehingga menimbulkan rasa nyeri.

2. Tahap 2: Eksudasi

Cairan yang keluar dari pembuluh darah karena permeabilitas vaskuler yang meningkat, sel-sel fagosit, jaringan mati, serta produk inflamasi lain akan bercampur membentuk eksudat. Eksudat yang muncul dapat berupa eksudat purulen, eksudat serosa, dan eksudat sanguinosa.

3. Tahap 3: Reparasi

Pada tahap reparasi akan terjadi pembentukan kembali jaringan yang telah rusak dengan jaringan fibrosa. Jaringan ini sering disebut sebagai jaringan parut (sikatrik).

2.2.1 Sel-sel Inflamasi

Sel-sel imun nonspesifik yaitu sel mast, eosinofil, basofil, neutrofil, dan makrofag jaringan memiliki peran penting dalam proses inflamasi. Sel-sel sistem imun non spesifik tersebut diproduksi lalu disimpan untuk persediaan sementara dalam sumsum tulang. Hidupnya tidak lama dan jumlah yang diperlukan untuk digunakan di tempat inflamasi dipertahankan oleh sel-sel baru dari persediaan di sumsum tulang. Neutrofil sebagai sel utama pada inflamasi dini akan bermigrasi ke jaringan. Puncak neutrofil ini terjadi pada 6 jam pertama inflamasi, dan untuk memenuhi kebutuhan tersebut diperlukan produksi neutrofil yang meningkat dalam sumsum tulang. Manusia dewasa yang normal akan memproduksi neutrofil di atas 10^{10} per harinya, namun dapat meningkat sampai 10 kali lipat pada saat terjadi inflamasi (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Saat terjadi inflamasi akut, neutrofil dalam sirkulasi dapat dengan segera meningkat dari 5000 μ l hingga 30.000 μ l. Meningkatnya neutrofil tersebut disebabkan oleh migrasi neutrofil ke dalam sirkulasi dari sumsum tulang dan persediaan marginal dalam pembuluh darah. Persediaan marginal neutrofil ini adalah sel-sel yang untuk sementara menempel pada endotel yang tidak bersirkulasi. Kandungan leukosit dalam sirkulasi yaitu 45% dan dalam marginal yaitu 55% (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Inflamasi diperlukan sebagai suatu pertahanan *host* terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh, berperan sebagai komponen penyembuhan luka yang membutuhkan suatu komponen seluler untuk membersihkan debris pada area cedera, dan berperan dalam meningkatkan reparasi jaringan. Sel-sel fagosit diperlukan untuk menyingkirkan antigen dan akan mati di area cedera. Fagosit lalu melepaskan mediator inflamasi seperti radikal bebas anion superoksid, beberapa enzim, dan oksida nitrit untuk menghancurkan makromolekul dalam cairan eksudat. Respon inflamasi pun juga mempunyai risiko tersendiri yang harus diperhatikan oleh *host*. Proses inflamasi ini dapat berhenti dengan sendirinya atau dapat responsif terhadap adanya suatu terapi. Namun jika terapi yang dilakukan gagal, proses inflamasi yang kronis dapat terjadi dan dapat menyebabkan suatu penyakit akibat inflamasi itu sendiri. Jika terjadi rangsangan yang menyimpang dan menetap, inflamasi juga dapat meningkat. Reaksi inflamasi dapat berlanjut hingga menimbulkan penyakit dan kerusakan jaringan (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

2.2.2 Mediator Inflamasi

Inflamasi yang akut disebabkan oleh pengeluaran mediator dari jaringan yang rusak, leukosit, sel mast, dan komplemen. Jalur akhir semua respon inflamasi adalah sama, kecuali yang disebabkan oleh alergi yang dapat terjadi secara cepat dan menimbulkan inflamasi sistemik. Mediator inflamasi menyebabkan beberapa pertanda inflamasi yaitu panas, edem, kemerahan, nyeri dan gangguan fungsi pada area cedera (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Mediator penting dalam proses inflamasi adalah produk sel mast. Beberapa mediator produk sel mast ini menimbulkan pelebaran pembuluh darah (vasodilatasi), edem, dan meningkatkan adhesi neutrofil dan monosit ke endotel. Vasodilatasi dalam proses inflamasi ini bertujuan untuk mengalirkan lebih banyak darah yang membawa banyak molekul dan sel yang diperlukan untuk melawan antigen yang menimbulkan inflamasi. Sel mast juga melepaskan mediator dari pengaruh pengeluaran NP-Y atau NGF yang merupakan degranulator poten sel mast. Jadi, meskipun suatu inflamasi akut diawali oleh mediator yang berbeda, jalur dalam proses inflamasi akan tetap melibatkan sel mast (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Cedera yang langsung menimbulkan kerusakan jaringan atau jaringan yang rusak karena endotoksin dari mikroba akan melepaskan mediator seperti prostaglandin dan leukotrien yang akan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Sel mast ini dapat juga diaktifkan mikroba atau jaringan yang rusak melalui komplemen dan kompleks IgE-alergen atau neuropeptida. Mediator inflamasi produk sel mast terdiri dari (Baratawijaya dan Rengganis, 2010):

2.2.2.1 Mediator *preformed*

Salah satu respon pertama pada saat cedera yaitu pelepasan mediator *preformed*. Agregasi trombosit yang segera terjadi yang timbul menyertai kerusakan vaskuler berhubungan dengan pengeluaran mediator serotonin, yang akan memicu terjadinya vasokonstriksi, lalu agregasi trombosit dan pembentukan sumbatan trombosit. Mediator *preformed* lainnya yang juga akan dilepas yaitu enzim lisosom dan protease, heparin, histamin, faktor kemotaktif neutrofil dan eosinofil. Faktor-faktor tersebut akan menginduksi pelebaran pembuluh darah sehingga arus aliran darah akan mengarah ke tempat cedera sehingga dapat mengerahkan sel spesifik ke tempat cedera. Dampak pelepasan mediator ini adalah pada pembuluh darah dan otot sekitar, juga dapat menarik sel darah putih tertentu yang diperlukan dalam inflamasi dini (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

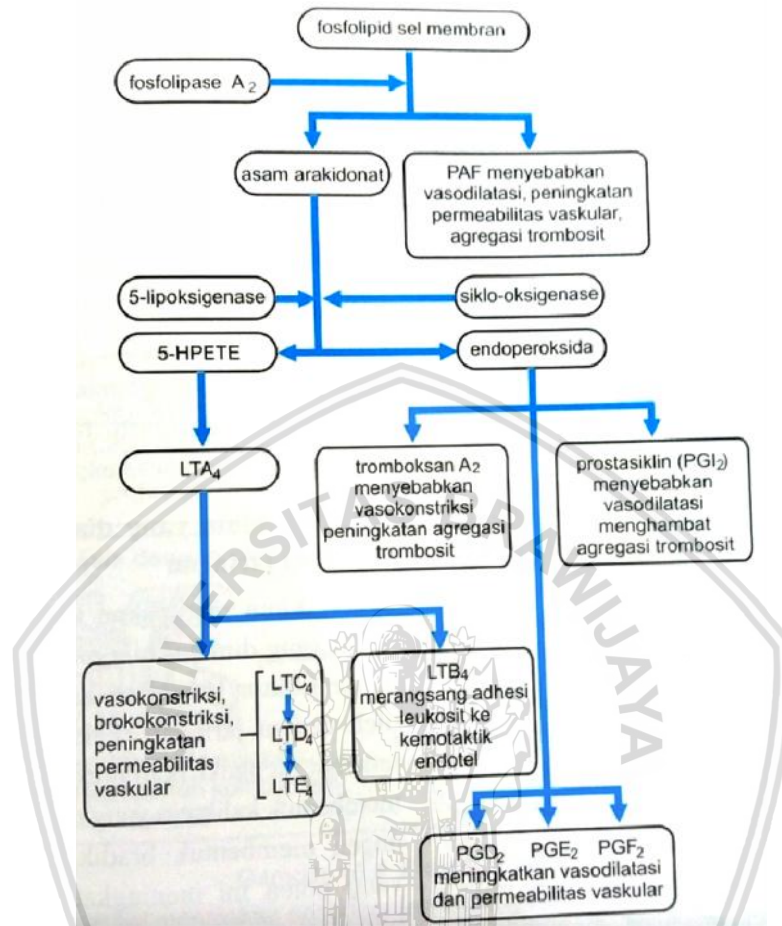
2.2.2.2 Mediator asal lipid

Fosfolipid yang ditemukan pada berbagai macam sel (neutrofil, monosit, makrofag, dan sel mast) dari jaringan yang rusak dipecah menjadi *LysoPAF* dan asam arakidonat. *LysoPAF* dipecah menjadi PAF yang akan menimbulkan agregasi trombosit dan berbagai inflamasi seperti aktivasi dan degranulasi eosinofil, kemotaksis, serta aktivasi neutrofil. PAF merupakan fosfolipid yang dibentuk oleh makrofag, sel mast, leukosit, dan sel endotel. Efek yang ditimbulkan serupa dengan inflamasi yang terjadi saat alergi yaitu melalui IgE pada urtikaria dingin dan anafilaksis, dan juga memiliki peran dalam syok yang ditimbulkan oleh endotoksin. Sedangkan asam arakidonat akan dimetabolisme

melalui 2 jalur, yaitu siklooksigenase dan lipoksigenase (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Enzim siklooksigenase (COX) dan enzim lipoksigenase (LOX) berperan dalam metabolisme asam arakidonat. Metabolisme asam arakidonat melalui jalur COX akan menghasilkan prostaglandin (PG) dan tromboksan (TX), sedangkan metabolisme asam arakidonat yang melalui jalur lipoksigenase akan menghasilkan Leukotrien (LT). Produksi berbagai macam PG dilakukan oleh berbagai macam sel, seperti monosit dan makrofag yang menghasilkan sejumlah PGE_2 dan PGF_2 , neutrofil yang menghasilkan PGE_2 dalam jumlah sedang, dan sel mast yang menghasilkan PGD_2 . Prostaglandin mempunyai efek fisiologis yaitu meningkatkan permeabilitas dan dilatasi pembuluh darah, serta induksi kemotaksis neutrofil. Sedangkan tromboksan mempunyai efek menimbulkan konstiksi vaskuler dan agregasi trombosit (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Untuk asam arakidonat yang dimetabolisme melalui jalur lipoksigenase akan menghasilkan 4 Leukotrien, yaitu LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , dan LTE_4 . Leukotrien diproduksi oleh berbagai sel inflamasi seperti makrofag, monosit, dan sel mast. LTC_4 , LTD_4 , dan LTE_4 dahulu disebut SRS-A yang berfungsi menginduksi kontraksi otot polos. LTB_4 merupakan mediator yang berfungsi sebagai kemoatraktan yang poten untuk neutrofil (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).



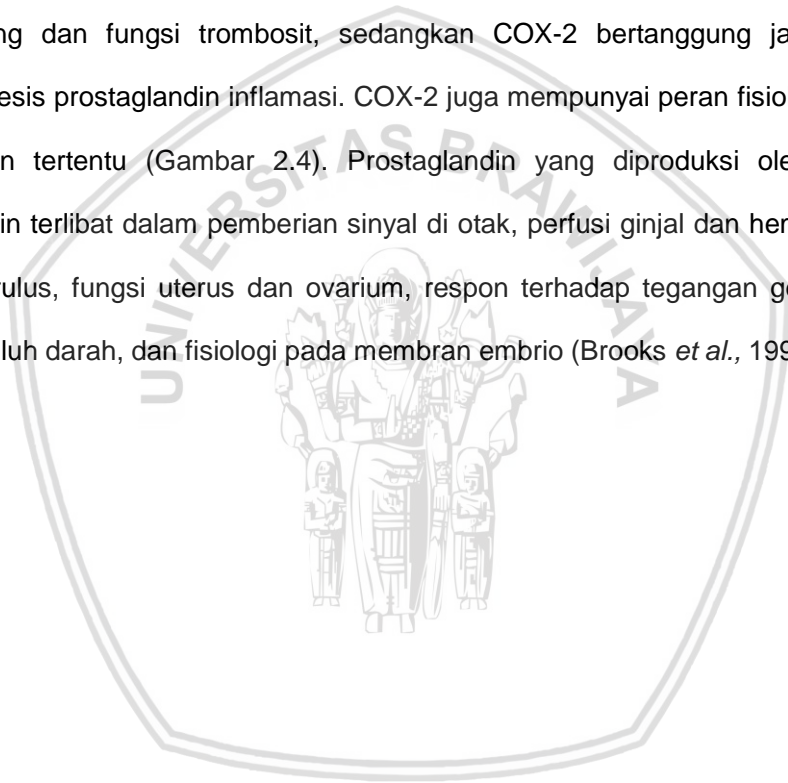
Gambar 2.3 Metabolisme Asam Arakidonat (Baratawijaya dan Rengganis, 2010)

2.2.3 Perbedaan Enzim Siklooksigenase-1 dan Siklooksigenase-2

Perbedaan COX-1 dan COX-2 terletak pada ekspresi dan pola induksinya. Pada kondisi fisiologis, ekspresi COX-1 ditemukan pada semua jaringan, sedangkan COX-2 hanya terbatas pada ginjal, otak, testis, dan sel epitel trakea. Meskipun ekspresi COX-1 dominan pada usus, COX-2 juga ditemukan dalam jumlah tertentu pada permukaan sel mukosa tikus dan dalam usus manusia. Enzim COX menunjukkan pola induksi yang berbeda. COX-2 dapat meningkat 20 kali lipat pada makrofag, monosit, sinoviosit, kondrosit, fibroblast, dan sel

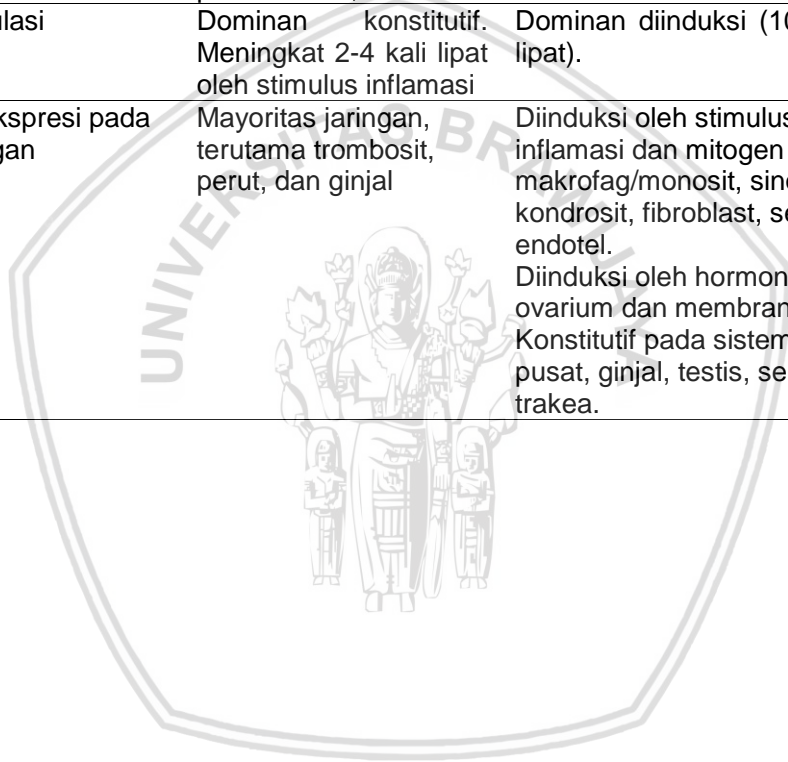
endotel dengan berbagai stimulus selama proses inflamasi. Sebaliknya, aktifitas COX-1 tidak terpengaruh atau meningkat secara marginal saja (2 sampai 4 kali lipat) (Brooks *et al.*, 1999).

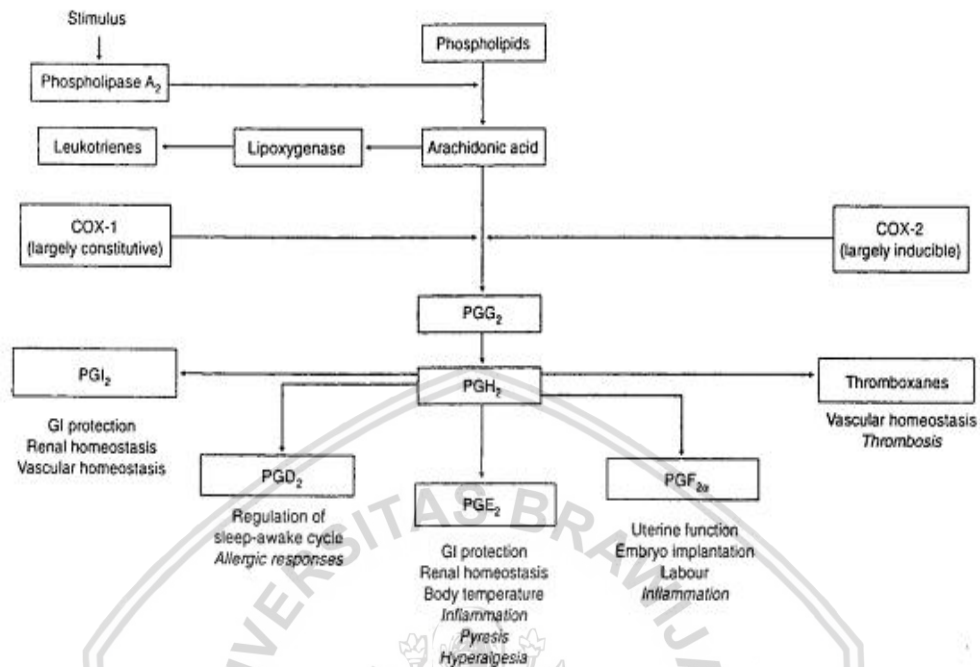
Lokasi dan pola ekspresi kedua isoform tersebut menunjukkan bahwa COX-1 bertanggung jawab atas produksi prostaglandin yang penting terhadap respon autokrin/parakrin terhadap hormon dan pemeliharaan integritas mukosa lambung dan fungsi trombosit, sedangkan COX-2 bertanggung jawab atas biosintesis prostaglandin inflamasi. COX-2 juga mempunyai peran fisiologis pada jaringan tertentu (Gambar 2.4). Prostaglandin yang diproduksi oleh COX-2 mungkin terlibat dalam pemberian sinyal di otak, perfusi ginjal dan hemodinamik glomerulus, fungsi uterus dan ovarium, respon terhadap tegangan geser pada pembuluh darah, dan fisiologi pada membran embrio (Brooks *et al.*, 1999).



**Tabel 2.1 Struktur, Distribusi, dan Regulasi dari COX-1 dan COX-2
(Brooks et al., 1999)**

	COX-1	COX-2
cDNA	Kromosom 9; 22 kB	Kromosom 1; 8,3 kB
mRNA	2,8 kB	4,5 kB
Protein	72 kDa; 599 asam amino	72 kDa; 604 asam amino
Homolog	Asam amino; 90% jenis diantaranya untuk kedua isoform; nilsi V_{maks} dan K_m untuk asam arakidonat	
Perbedaan	Glukokortikoid menghambat ekspresi dari COX-2, tidak pada COX-1; sisi aktif COX-2 lebih besar dari COX-1	
Regulasi	Dominan konstitutif. Meningkatkan 2-4 kali lipat oleh stimulus inflamasi	Dominan diinduksi (10-20 kali lipat).
Tereksresi pada jaringan	Mayoritas jaringan, terutama trombosit, perut, dan ginjal	Diinduksi oleh stimulus inflamasi dan mitogen pada makrofag/monosit, sinoviosit, kondrosit, fibroblast, sel endotel. Diinduksi oleh hormon pada ovarium dan membran janin. Konstitutif pada sistem saraf pusat, ginjal, testis, sel epitel trakea.

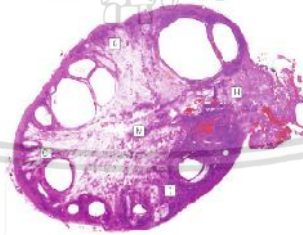




Gambar 2.4 COX-1 dan COX-2 dalam Produksi Prostaglandin (Brooks *et al.*, 1999)

2.3 Histologi Ovarium dan Perkembangan Folikel dalam Ovarium

2.3.1 Struktur dan Jaringan Ovarium



Gambar 2.5 Ovarium (Lowe *and* Anderson, 2015)

Keterangan: Hilum (H), Medula (M), dan Korteks (C)

Ovarium merupakan sepasang organ yang kecil, pipih, dan berbentuk seperti telur yang terletak di lateral kanan dan kiri dari kavum pelvis. Sepasang ovarium ini memiliki 2 fungsi, yaitu:

- 1) Sebagai tempat maturasi ovum

- 2) Sebagai tempat organ endokrin yang memproduksi hormon steroid untuk persiapan endometrium dalam konsepsi dan kehamilan sejak terjadi fertilisasi (Lowe and Anderson, 2015).

Permukaan ovarium tertutup oleh epitel selapis, biasanya berbentuk kuboid atau kolumnar, tetapi umumnya menipis seiring bertambahnya umur dan ketika ovarium membesar. Epitel tersebut berhubungan dengan peritoneum di bagian hilum ovarium (walaupun secara struktural berbeda dari sel mesotelium dari peritoneum). Epitel ini disebut epitel germinal, namun sebenarnya penggunaan kata tersebut tidak tepat karena sel epitel tersebut bukan sumber dari gamet betina. Permukaan sel epitel mempunyai permukaan yang menonjol keluar yang terdiri dari mikrovili dan tambahan silia; banyak mitokondria dan vesikel pinositosis kecil yang terkait dengan dasar dari beberapa mikrovili (Lowe and Anderson, 2015).

Permukaan ovarium biasanya terdapat celah yang tidak teratur, dan celah tersebut juga dilapisi oleh epitel permukaan. Leher celah dapat menutup meninggalkan pulau dari epitel permukaan dalam korteks ovarium. Sekresi cairan oleh sel tersebut kemudian mengubah pulau epitel permukaan menjadi suatu kista yang umum, termasuk kista germinal. Sel epitel permukaan ini menunjukkan sedikit perubahan selama siklus menstruasi tetapi biasanya berlangsung selama kehamilan. Membran dasar substansial (*tunica albuginea*) memisahkan sel permukaan dari jaringan ovarium yang mendasari ovarium yang matur (Lowe and Anderson, 2015).

Ovarium terdiri dari 3 bagian, yaitu hilum, medula, dan korteks. Dalam hilum terdapat pembuluh darah, saluran limfe, dan saraf yang masuk dan keluar dari ovarium dan berlanjut sampai ke medula, inti pusat dari ovarium. Selain

pembuluh darah dan limfe, medula dan hilum juga mengandung sisa-sisa embrionik dari duktus *Wolfii* dan kelompok hilus atau sel hilar. Sisa dari duktus *Wolfii* bertahan sebagai tubulus ireguler yang dilapisi oleh epitel pipih atau epitel kuboid (*rete ovarii*). Sel hilus ini secara histologi identik dengan sel interstitial (sel *Leydig*) dari testis dan berbentuk bulat atau oval dengan granula eosinofilik atau sitoplasma berbusa yang mengandung pigmen seperti *brown lipofuscin* yang bersifat padat. Sel hilus kadang-kadang mengandung kristaloid reinke dan beberapa juga mengandung badan hialin eosinofilik. Kelompok kecil sel hilus sering ditemukan dekat dengan saraf dan pembuluh darah. Medula ovarium sering mengandung gugus sel stroma yang identik dengan sel stroma yang menempati sebagian besar korteks. Korteks ovarium mempunyai 2 komponen, yaitu stroma pendukung dan struktur yang memproduksi gamet beserta derivatnya. Proporsi dan penampilan dari kedua komponen tersebut dalam ovarium akan bergantung pada usia dan stimulasi hormonal (Lowe and Anderson, 2015).

Stroma pada korteks terdiri dari sel berbentuk fibroblas yang erat dan berbentuk *spindle*. Sel stroma ini tersusun sembarangan atau dalam pola belang. Sitoplasma sel-sel ini kaya akan ribosom dan mikrofilamen; mitokondria juga banyak dan cenderung terkumpul di sekitar nukleus. Vesikel mikropinositosis ditemukan berhubungan dengan permukaan sel, dan ada sejumlah kecil tetesan lipid. Serabut retikulin dan kolagen antara sel stroma sebagian menonjol di bagian luar korteks. Kolagenisasi progresif daerah ini dimulai sejak dini dalam kehidupan reproduksi dan bertambah seiring berjalannya waktu sehingga saat menopause kolagenisasi ini hampir menyeluruh. Berbagai sifat sel stroma ovarium dan jumlah lipid yang mengandung sel bergantung pada stimulasi

hormon. Peningkatan akumulasi lipid pada sel stroma disebut luteinisasi sel stroma dan sangat menonjol selama kehamilan. Stroma ovarium mempunyai tiga fungsi utama sebagai berikut:

- a) Menyediakan struktur pendukung untuk perkembangan ovum
- b) Memberi peningkatan pada teka interna dan teka eksterna di sekitar folikel yang berkembang
- c) Mensekresikan hormon steroid (Lowe *and* Anderson, 2015)

Terdapat tiga jenis sel stroma yang menghasilkan hormon steroid, yaitu sebagai berikut:

- 1) Sel stroma yang mengelilingi folikel (yaitu lapisan teka)
- 2) Sel stromal *luteinized* yang kaya lipid
- 3) Populasi sel stroma, disebut sel stroma aktif enzimatik (*enzymically active stromal cells/EASC*), yang menunjukkan aktivitas enzim oksidatif dan aktivitas enzim yang lain (Lowe *and* Anderson, 2015).

EASC sangat banyak pada wanita pascamenopause. Mereka menyebar dalam korteks dan medula, dan beberapa di antaranya mensekresikan hormon steroid androgenik (Lowe *and* Anderson, 2015).

2.3.2 Produksi dan Maturasi Gamet di Ovarium

2.3.2.1 Pembelahan Mitosis dari *Primordial Germ Cells*

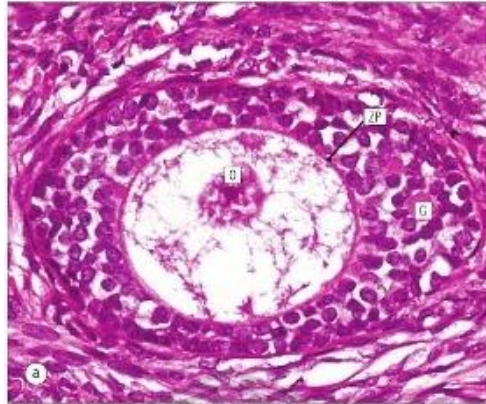
Oogonia berkembang dengan cara mitosis dalam ovarium janin yang sedang berkembang. Selama trimester kedua kehamilan, pembelahan mitosis berhenti, dan sejumlah besar oogonia membesar disebut oosit primer. Pada tahap ini, jumlah oosit primer beberapa juta di setiap ovarium, namun banyak yang mengalami degenerasi. Saat lahir, setiap ovarium mengandung sekitar 1

juta oosit. Jumlah oosit terus menurun selama hidup dan pada saat terjadinya pubertas jumlah oosit berkurang menjadi sekitar seperempat juta (Lowe and Anderson, 2015).

2.3.2.2 Folikel Primordial dan Folikel Primer

Saat pubertas, sekresi hormon FSH dari hipofisis merangsang perkembangan sejumlah kecil (\pm 30-40) folikel primordial. Langkah pertama adalah pembesaran oosit, yang dikaitkan dengan peningkatan ukuran sel granulosa di sekitarnya sehingga menjadi kuboidal atau kolumnar. Struktur folikel pada tahap ini disebut folikel primer unilaminar. Sekresi FSH yang terus berlanjut menginduksi pembelahan sel granulosa untuk menghasilkan struktur yang berlapis-lapis yang mengelilingi oosit yang berkembang, dan lapisan glikoprotein yang berbeda dari bahan eosinofilik antara oosit dan sel-sel granulosa tersebut. Lapisan ini disebut zona pelusida dan dilalui oleh mikrovili yang menonjol keluar dari oosit dan oleh prosesus sitoplasma yang tipis dari lapisan dalam sel granulosa. Folikel ini dikenal sebagai folikel primer multilaminar (Lowe and Anderson, 2015).

Sementara itu, sel stroma ovarium mencapai sekitar lapisan konsentris sekitar folikel yang berkembang untuk membentuk susunan seperti kapsul. Pada tahap ini, mayoritas folikel mengalami degenerasi dengan proses yang disebut atresia. Sejumlah kecil folikel, terus berkembang, walaupun degenerasi atretik masih terjadi pada semua tahap sehingga hanya beberapa folikel yang mencapai kematangan penuh (Lowe and Anderson, 2015).

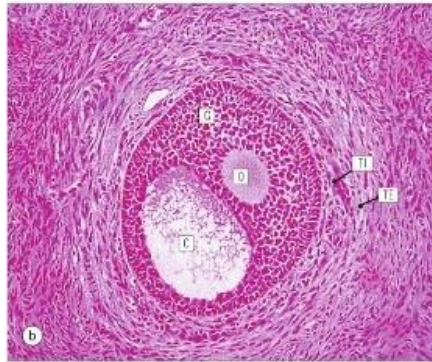


Gambar 2.6 Folikel Primer (Lowe and Anderson, 2015)

Keterangan: Sel granulosa (G), zona pelusida (ZP), oosit (O)

2.3.2.3 Folikel Sekunder

Ketika maturasi folikel berlanjut, ketebalan sel granulosa meningkat dan lapisan luar sel stroma ovarium mulai berdiferensiasi menjadi dua lapisan. Lapisan dalam sel stroma teka yaitu teka interna mengalami peningkatan ukuran seperti saat sel-sel mengembangkan retikulum endoplasma halus yang menonjol dan mitokondria dengan krista tubuler yang memproduksi hormon steroid. Sel teka interna ini mensekresikan estrogen. Lapisan ini juga menambah jaringan kapiler yang menonjol. Lapisan luar sel stroma yang disebut teka eksterna tetap kecil, padat, dan tidak diketahui fungsi sekresinya. Folikel dengan struktur teka interna dan teka eksterna ini disebut folikel sekunder (Lowe and Anderson, 2015).



Gambar 2.7 Folikel Sekunder (Lowe and Anderson, 2015)

Keterangan: Sel granulosa (G), kavum berisi cairan (C), teka interna(TI), teka eksterna (TE), oosit (O)

2.3.2.4 Folikel Tersier (*Graafian Follicle*)

Saat proses pembelahan, folikel terisi cairan yang muncul di lapisan sel granulosa yang mengelilingi oosit. Lapisan ini membesar untuk membentuk rongga berisi cairan yang disebut antrum yang ukurannya semakin bertambah. Cairan antrum ini sedikit kental dan kaya akan asam hialuronat. Oosit terletak pada satu sisi folikel ini dan dipisahkan dari cairan folikel oleh sel granulosa yang disebut *cumulus oophorus*. Folikel ini disebut sebagai folikel tersier atau folikel de Graaf yang sudah matang untuk ovulasi (Lowe and Anderson, 2015).

Tahap pertama meiosis bertujuan untuk menghasilkan gamet haploid dan badan polar yang kadang-kadang dapat dilihat menempel pada oosit. Oosit ini disebut oosit sekunder. Pematangan folikel memakan waktu sekitar 15 hari, yaitu sampai folikel dewasa sudah siap untuk ovulasi. Teka interna mensekresikan sejumlah estrogen untuk merangsang proliferasi endometrium dalam persiapan implantasi sel telur dibuahi (Lowe and Anderson, 2015).



Gambar 2.8 Folikel Tersier (Folikel de Graaf) (Lowe and Anderson, 2015)

Keterangan: Antrum (A), oosit (O), *cumulus oophorus* (C)

2.3.2.5 Ovulasi

Saat ovulasi, folikel de Graaf biasanya sangat besar sehingga mendistorsi permukaan ovarium, tampak saat terdapat massa kistik kecil melintang di permukaan ovarium yang hanya ditutupi oleh lapisan tipis epitel germinal dan membran, dan sebuah zona tipis dari sel stroma pada korteks ovarium. Stimulasi ovulasi mungkin disebabkan lonjakan hormon *luteinizing* (LH) dari kelenjar hipofisis (pituitari) yang menginduksi penyelesaian tahap pertama meiosis dan mungkin juga menyebabkan pecahnya struktur folikel. Sebelum meninggalkan ovarium, oosit dapat terlepas dari dinding folikel dan melayang bebas di cairan folikel, dikelilingi oleh cincin sel granulosa yang ireguler yang tetap melekat pada oosit. Cincin sel granulosa ireguler tersebut disebut korona radiata (Lowe and Anderson, 2015).

Area pada dinding folikel mengalami kontak yang dalam dengan epitel germinal yang menyelimuti permukaan ovarium terurai dan cairan folikel yang mengandung oosit dikeluarkan ke rongga peritoneum. Oosit dengan *corona radiata* di sekitarnya kemudian ditarik ke dalam lubang infundibulum dari tuba

falopi. Hal ini dimungkinkan menggunakan cara melambaikan *fimbriae* pada tepi infundibulum. Rupturnya folikel menyebabkan perdarahan dari lapisan yang didekompresi terutama dari teka interna. Bekuan darah mengisi antrum dengan. Sejumlah kecil darah juga bisa masuk ke dalam rongga peritoneum. Pengeluaran darah dan cairan folikel ke permukaan peritoneum dianggap bertanggung jawab atas pertengahan siklus menstruasi yaitu pada hari ke-14 sampai hari ke-16. Permukaan peritoneum ini sensitif terhadap rasa sakit. Nyeri perut bagian bawah biasanya dialami beberapa wanita pada pertengahan siklus (Lowe and Anderson, 2015).



Gambar 2.9 Oosit (Lowe and Anderson, 2015)

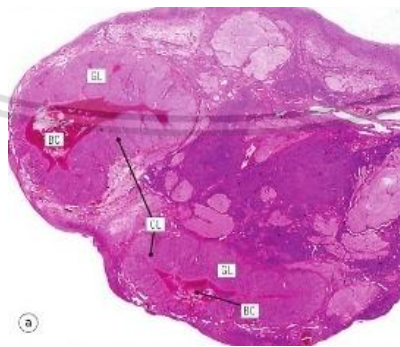
Keterangan: Oosit (O), *cumulus oophorus* (C), sel granulosa (G), lapisan teka (T)

2.3.2.6 Korpus Luteum

Setelah ovulasi, sisa-sisa folikel berubah atas pengaruh keberlanjutan sekresi LH dari kelenjar pituitari. Lumen yang berisi gumpalan folikel yang disebut sebagai *corpus haemorrhagicum* mengalami pengaturan dan fibrosis progresif selama minggu-minggu berikutnya. Perubahan utama terjadi pada sel granulosa dan sel teka interna. Dalam sel ini, LH menginduksi perubahan yang disebut luteinisasi yang mengubah sisa folikel menjadi struktur endokrin. Struktur ini disebut sebagai korpus luteum. Dengan demikian, sel granulosa membesar

dan memperoleh jaringan retikulum endoplasma yang halus, lalu mengalami distensi dengan lipid. Sel ini disebut sebagai sel granulosa lutein yang akan mensekresikan progesteron (Lowe *and* Anderson, 2015).

Beberapa sel teka interna yang telah dilengkapi dengan retikulum endoplasma yang halus, juga mengakumulasi lipid dan tetap menjadi sel teka lutein atau paralutein. Sel teka interna tersebut melanjutkan sekresi estrogennya seperti sebelum ovulasi. Namun, sebagian besar sel teka interna dan sel eksterna mengalami involusi di tahap ini, yaitu menjadi kecil, padat dan berbentuk spindel. Oleh karena hal tersebut, korpus luteum memiliki area sentral dari jaringan fibrosis tempat gumpalan darah yang dikelilingi oleh zona kuning luas, sel granulosa lutein yang kaya lipid yang tersebar di daerah perifer. Septa fibrosis sebagian memisahkan gugus sel teka lutein dan massa granulosa lutein. Pada ukuran maksimumnya, korpus luteum umumnya berbentuk ovoid hingga 2 cm dan lebar 1,5 cm. Hal ini biasanya terjadi pada siklus menstruasi sekitar hari ke-20. Korpus luteum kemudian mulai mengalami involusi, kecuali jika siklusnya terputus karena fertilisasi pada tuba falopi (Lowe *and* Anderson, 2015).

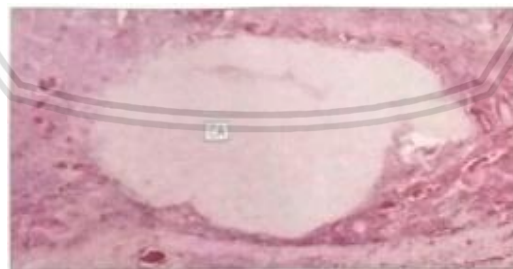


Gambar 2.10 Korpus Luteum (Lowe *and* Anderson, 2015)

Keterangan: Korpus luteum (CL), gumpalan darah (BC), sel granulosa lutein (GL)

2.3.2.7 Korpus Albikan

Normalnya, involusi pada korpus luteum dimulai dengan mengecilnya ukuran sel granulosa dan sel teka lutein, serta dengan munculnya vakuola di sitoplasma eosinofilik yang sebelumnya seragam. Perkembangan perubahan ini menyebabkan berkurangnya sekresi progesteron dan estrogen oleh dua tipe sel. Pada saat yang bersamaan, sel yang berbentuk spindel dari teka eksterna dan fibroblas yang berbentuk spindel membentuk septa yang berserat menghasilkan kolagen dengan cepat yang menggantikan sel lutein yang mengalami involusi. Sekitar hari ke-26 dari siklus menstruasi, sel yang mensekresi hormon akan hilang sehingga kadar progesteron dan estrogen turun drastis. Hal ini akan memberikan dampak yang signifikan pada endometrium. Hasil akhir dari involusi korpus luteum adalah massa ovoid kecil dari jaringan kolagen yang aselular yang disebut dengan hialin dengan konfigurasi fisik umum korpus luteum. Struktur ini disebut korpus albikan. Korpus albikan akan tetap di ovarium, ukurannya akan semakin kecil seiring berjalannya waktu tetapi tidak akan pernah hilang (Lowe *and* Anderson, 2015).



Gambar 2.11 Korpus Albikan (Lowe *and* Anderson, 2015)

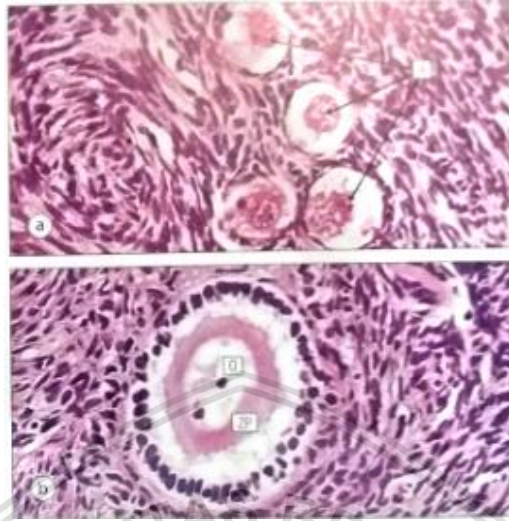
Keterangan: Corpus Albican (CA)

2.3.2.8 Folikel Atresia

Dari sejumlah besar bentuk oogonia di dalam rahim dari pembelahan mitosis *primitive germ cells*, hanya sekitar 500-600 yang mencapai kematangan

dan ovulasi penuh selama masa reproduksi wanita. Beberapa gagal berkembang dan yang lain menjalani proses yang disebut atresia. Atresia dapat terjadi pada tahap apapun. Hal ini paling banyak terjadi selama kehidupan intrauterin yaitu ketika jumlah oosit primer sangat berkurang. Atresia berlanjut selama masa bayi, anak, dan tahun-tahun reproduksi. Degenerasi oosit primer dan sekunder dapat dilihat pada pemeriksaan histologis ovarium manapun (Lowe *and* Anderson, 2015).

Atresia dapat terjadi pada setiap tahap pengembangan folikel. Jika folikelnya kecil yaitu pada folikel primer dan sekunder, komponen folikel akan mengalami degenerasi seluler dan reabsorpsi lengkap sehingga tidak meninggalkan bekas. Namun, jika folikelnya lebih besar yaitu pada folikel tersier dengan komponen selular yang substansial, maka akan mengalami disintegrasi dan penggantian bertahap oleh jaringan hialin fibrosa. Oosit akan hancur dan sel granulosa terpisah dan terdegenerasi, sedangkan zona pelusida kolaps dan mengerut namun tetap bisa diidentifikasi. Seringkali sebuah membran seperti kaca berkembang di antara sel-sel granulosa yang terdegenerasi dan lapisan-lapisan di luarnya. Ini mungkin akan mengalami proliferasi sementara, dan mungkin menyediakan sumber jaringan fibrokolagen yang akhirnya menggantikan folikel atresia. Ketika folikel yang besar telah mengalami atresia, bekas jaringan kolagen akan membentuk korpus fibrosum. Korpus fibrosum ini menyerupai korpus albikan namun bentuknya kecil (Lowe *and* Anderson, 2015).



Gambar 2.12 Folikel Atresia (Lowe and Anderson, 2015)

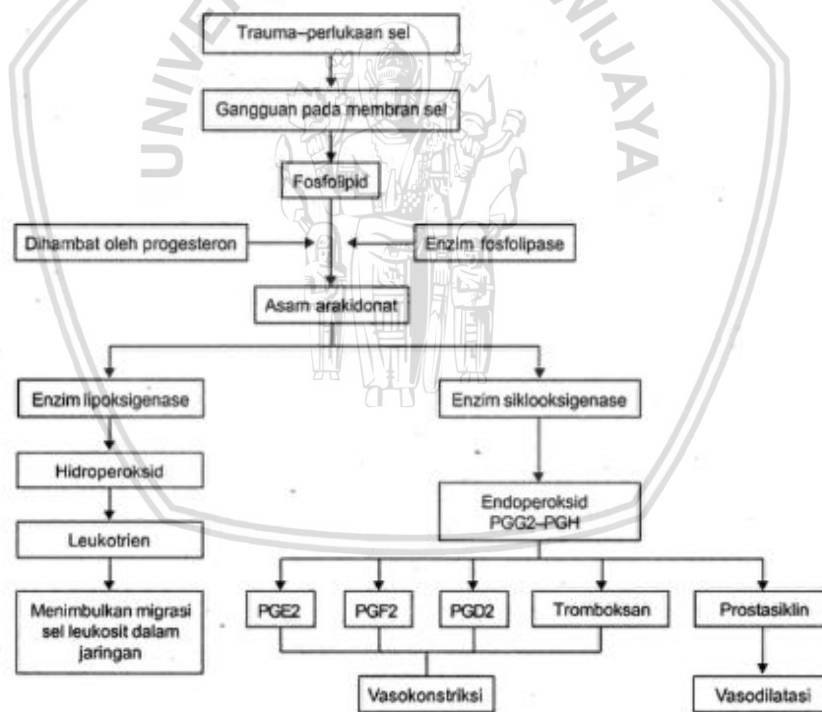
Keterangan: Folikel atresia (A), degenerasi oosit (O), zona pelucida yang kolaps (ZP)

2.4 Hubungan Inflamasi dan Ovulasi

2.4.1 Masa Menstruasi

Saat menstruasi banyak ditemukan adanya prostaglandin dalam darah menstruasi. Oleh karena itu, prostaglandin diduga berperan penting dalam berlangsungnya hormonal pada siklus menstruasi. Penurunan hormon progesteron yang semula 40-50 mg/hari dimulai sejak memasuki umur pertengahan dari korpus luteum. Terjadinya penurunan pada hormon progesteron ini akan menimbulkan dampak yaitu hilangnya pertahanan membran yang banyak mengandung fosfolipid sehingga asam arakidonat yang diproduksi oleh jaringan tersebut makin meningkat. Hal ini terjadi seiring dengan menurunnya progesteron darah. Oleh karena itu, sel lisosom juga akan semakin mampu melakukan sintesis untuk membentuk reaksi kimia sehingga dihasilkan leukotrien. Leukotrien ini berperan dalam menyebabkan terjadinya infiltrasi leukosit ke dalam jaringan endometrium (Manuaba, 2007).

Sebagian besar asam arakidonat mengikuti reaksi sehingga terbentuk PGF_2 dan tromboksan untuk memicu vasokonstriksi arteri spiralis. Bersamaan dengan hal tersebut, dibentuk juga prostasiklin sebagai faktor vasodilatasi. Semakin menurun kadar progesteron dalam darah, maka semakin meningkat produksi PGF_2 , prostasiklin, dan tromboksan dengan peran dominan untuk vasokonstriksi arteri spiralis. Vasokonstriksi arteri spiralis ini memberikan dampak yaitu iskemia pada endometrium di bagian spongiosa dan kompakta sehingga terjadi nekrosis, perdarahan, dan infiltrasi leukosit di kavum uteri (Manuaba, 2007)

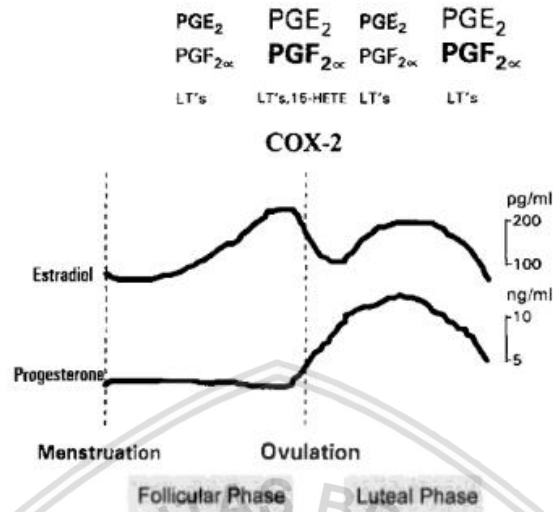


Gambar 2.13 Proses Inflamasi dalam Siklus Menstruasi (Manuaba, 2007)

2.4.2 Fase Folikuler

Efek eikosanoid sangat penting dalam reproduksi yaitu kontraksi otot polos (pada menstruasi dan persalinan), modulasi dari sistem imun (pada implantasi dan kehamilan), reaksi inflamasi fisiologis seperti meningkatkan aliran darah, meningkatkan permeabilitas vaskular, mengaktivasi enzim proteolitik (pada ovulasi, pematangan servix, dan persalinan), dan regulasi pembuluh darah (Marks *and* Fürstenberger, 1999). Eikosanoid adalah suatu senyawa yang dihasilkan oleh tubuh yang merupakan gugus senyawa mirip hormon. Eikosanoid ini disintesis dari asam lemak *polyunsaturated/Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang mengandung 20 atom karbon (asam eikosanoat) dengan 3, 4, atau 5 ikatan rangkap. Contoh eikosanoid adalah prostaglandin (PG), tromboksan (TX), dan leukotrien (LT). Asam arakidonat merupakan senyawa bahan asal sebagian besar eikosanoid yang dibentuk dalam tubuh, baik asam arakidonat yang diperoleh dari makanan maupun yang disintesis dari linoleat (Marks *et al*, 2000).

Fungsi ovarium selama masa reproduksi terbagi menjadi 2 yaitu saat fase folikular dan fase luteal. Saat fase folikular terjadi proses pematangan folikel, pemilihan salah satu folikel, maturasi dari oosit, dan ruptur dari folikel de Graaf untuk melepaskan oosit ke tuba falopi. Sedangkan saat fase luteal, korpus luteum berkembang dan memproduksi progesteron. Jika terjadi fertilisasi, maka progesteron adalah senyawa esensial yang berperan penting dalam mempertahankan embrio. Namun jika tidak terjadi fertilisasi, maka korpus luteum akan mengalami luteolisis yang kemudian akan terjadi menstruasi. Banyak perhatian dari siklus ini yang terfokus pada peran eikosanoid dalam ovulasi, regresi korpus luteum, dan steroidogenesis (Marks *and* Fürstenberger, 1999).



Gambar 2.14 Peran Eikosanoid yang Mungkin pada Fungsi Ovarium (Marks and Fürstenberger, 1999)

Ovulasi adalah pelepasan dari oosit yang matur dari folikel de Graaf. Proses ini dipicu oleh *luteotropic hormone* (LH) *surge* dengan aktivitas LH dan *follicle-stimulating hormone* (FSH) yang saling melengkapi. Hal ini disertai dengan rupturnya jaringan pada permukaan ovarium yang didasari oleh peristiwa biokimia dan menyerupai reaksi inflamasi akut dengan hiperemia, bentukan edema, dan invasi leukosit dimana produksi eikosanoid biasanya meningkat (Marks and Fürstenberger, 1999).

Cairan folikel pada manusia mengandung prostaglandin F₂ (PGF₂), 6-keto-PGF₁, PGE₂, tromboksan B₂ (TXB₂), leukotrien B₄ (LTB₄), dan leukotrien C₄ (LTC₄). Konsentrasi PGF₂ meningkat selama fase *pre-ovulatory* (fase folikuler). Penelitian menggunakan hewan menunjukkan bahwa pada fase *pre-ovulatory* terjadi peningkatan produksi prostaglandin dari folikel pada ovarium yang memiliki peran sangat penting dalam ovulasi. Gonadotropin dapat dengan cepat menginduksi produksi prostaglandin secara *in-vitro*. Oleh karena itu, kenaikan LH

pada saat fase folikuler mungkin bertanggung jawab atas stimulasi produksi prostaglandin ovarium. Berbeda dengan sistem yang lain, kenaikan prostaglandin ini tidak disebabkan oleh peningkatan ketersediaan asam arakidonat dari membran fosfolipid, namun dengan meningkatnya aktifitas siklooksigenase (COX). Peningkatan aktifitas COX ini membutuhkan RNA dan sintesis protein. Hal ini juga diketahui bahwa inhibitor dari COX dapat menghambat atau menunda ovulasi yang dapat dikembalikan dengan memberikan PGF_2 . COX-2 diinduksi sesaat sebelum folikel ruptur dan hal tersebut dapat menyebabkan peningkatan fungsi prostaglandin yang menyertai atau menyebabkan rupturnya folikel. Induksi COX-2 sebelum ovulasi yang lebih awal bahkan telah dipertimbangkan sebagai penentu molekuler dari ovulasi. Hipotesis ini selanjutnya didukung oleh percobaan baru-baru ini dengan tikus yang mengalami delesi gen COX-2 dan gagal mengalami ovulasi (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

PGF_2 dan PGE_2 merupakan prostaglandin yang peran pentingnya dalam ovulasi dapat diamati pada berbagai penelitian pada manusia dan hewan. Peran PGE_2 yaitu menginduksi pematangan oosit, meningkatkan aliran darah lokal dan permeabilitas vaskular, serta menyebabkan edema lokal yang mendahului ovulasi. PGF_2 merupakan eikosanoid penting untuk ruptur folikel karena menginduksi proteolisis dan berperan dalam proses kolagenolisis. PGF_2 juga berperan meningkatkan kontraktilitas ovarium dan sebagai antagonis PGE_2 yang menginduksi hiperemia (*PGE_2 -induced hyperemia*). Selanjutnya, pada ovarium di sebagian besar spesies, tingginya PGE_2 -9-keto-reduktase dapat mengubah PGE_2 menjadi PGF_2 . Konversi dari prostaglandin primer ini mungkin juga terkait secara signifikan dengan ovulasi (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Mengenai produk jalur lipoksigenase, ada beberapa penelitian yang menyelidiki peran produk metabolisme jalur lipoksigenase dalam maturasi dan pecahnya folikel. Aktivitas lipoksigenase (LOX) meningkat beberapa saat sebelum ovulasi. Inhibitor lipoksigenase dapat menghambat ovulasi dengan baik atau menghambat peningkatan produksi prostaglandin dan tingkat ovulasi. Adanya 5-lipoksigenase dan 12-lipoksigenase dapat ditemukan pada sel granulosa secara imunohistokimia. Setelah stimulasi gonadotropin, tingkat produksi leukotrien, prostaglandin dan asam hidroperoksieikosatetraenoat (HETE) meningkat. Hal itu terjadi dengan waktu yang berbeda dan memiliki fungsi berbeda juga untuk proses ovulasi. Sintesis LTB_4 meningkat dengan cepat setelah pemberian *human chorionic gonadotropin* (hCG), dan mencapai puncaknya dengan baik sebelum PGE_2 dan PGF_2 mencapai puncaknya dan dapat menyebabkan kemotaksis dari leukosit dan kemudian merangsang pelepasan lisozim. LTC_4 menunjukkan puncak pertamanya pada awal dan yang kedua beberapa jam setelah stimulasi gonadotropin (Marks *and* Fürstenberger, 1999). LTB_4 dan LTC_4 meningkat selama periode ovulasi dan inhibitor dari reseptor LTB_4 ini dapat menghambat ovulasi (Higuchi, *et al.*, 1995; Knight, 2014). Peptidoleukotrien mungkin penting untuk peningkatan permeabilitas vaskular dan kontraksi pembuluh darah setelah ovulasi terjadi. Sintesis 15-HETE berkorelasi dengan sintesis steroid dan fungsi ovarium, menunjukkan bahwa hal itu mungkin berperan dalam ovulasi mamalia. Selanjutnya terdapat sitokrom P-450 yang berasal dari metabolit asam arakidonat, misalnya asam epoksieikosatrienoat (EETs) yang dapat mengatur steroidogenesis sel granulosa (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Tromboksan juga diperkirakan berperan dalam proses maturasi folikel. Hal ini ditunjukkan oleh konsentrasi dari TXB₂ pada dinding folikel dan pada cairan folikel yang meningkat secara drastis pada folikel preovulatori (Murdoch, 1986; B dis *et al.*, 2014). TXB₂ merupakan metabolit stabil dari TXA₂ (Leung *and* Adashi, 2004). Agregasi dari platelet yang diperkirakan bersumber dari TXA₂ melekat pada sel endotel kapiler pada folikel preovulatori dan penggumpalan pada intravaskular dan ekstrasvaskular terjadi secara nyata (B dis *et al.*, 2014).

Kesimpulannya, eikosanoid diproduksi untuk maturasi folikel selama fase folikuler (sebelum ovulasi), dan ovulasi tersebut dapat dihambat secara farmakologis oleh penghambat biosintesis eikosanoid (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

2.4.3 Fase Luteal

Korpus luteum merupakan organ endokrin sementara yang penting untuk persiapan endometrium untuk meningkatkan reseptivitas endometrium dan untuk mempertahankan gamet yang telah dibuahi pada awal kehamilan. Saat menjelang akhir umur korpus luteum ini, reaksi apoptosis akan muncul sangat terkoordinasi dan menyebabkan degradasi dari korpus luteum (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Pada kera rhesus yang telah dilakukan infus inhibitor COX secara intraluteal pada setengah pertama fase luteal menyebabkan produksi progesteron menurun dan pemendekan fase luteal. Hal ini menunjukkan peran luteotropik COX untuk prostaglandin lokal. Konsentrasi PGE₂ dalam korpus luteum meningkat pada awal fase luteal dan menurun pada akhir fase luteal, sedangkan konsentrasi PGF₂ meningkat selama fase luteal akhir berhubungan

dengan penurunan PGE₂. PGE₂ tampaknya menyerupai efek luteotropik pada LH dalam menginduksi luteinisasi melalui transduksi sinyal siklik sehingga menghasilkan produksi progesteron yang meningkat, sedangkan PGF₂ bersifat luteolitik. Pada spesies non primata, PGF₂ yang berasal dari uterus adalah faktor luteolitik yang kuat, ditunjukkan dengan setelah dilakukan histerektomi menimbulkan persistensi pada korpus luteum. Namun, pada primata dan manusia, fungsi ovarium siklik tidak terpengaruh oleh histerektomi. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan anatomi dari pembuluh darah uterus dan ovarium primata yang memiliki suplai darah yang terpisah. Injeksi PGF₂ langsung ke ovarium kera rhesus menyebabkan penurunan konsentrasi progesteron sistemik dan onset perdarahan menstruasi yang lebih dini tanpa mempengaruhi tingkat LH (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

COX-1 ditunjukkan secara imunohistokimia terdapat pada sel luteal dan ekspresinya meningkat dari fase luteal awal sampai akhir. Ekspresi COX-2 pada sel luteal dirangsang oleh LH dan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH). Adanya sebagian besar reseptor prostaglandin di ovarium ditunjukkan dengan uji pengikat ligan (*ligand-binding assay*) dan ekspresi reseptor PGF₂, PGE₂ dan TXA₂ juga dianalisis dengan analisis protein dan mRNA. Namun, hanya PGF₂ dan PGE₂ yang tampaknya penting untuk fisiologi ovarium. PGF₂ diregulasi selama fase luteal dan dapat dikaitkan dengan apoptosis pada sel luteal tikus (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Banyak yang belum mengetahui mengenai peran lipoksigenase yang membentuk eikosanoid dalam fungsi korpus luteum. Secara imunohistokimia, 5-lipoksigenase diekspresikan terutama pada sel luteal kecil, sedangkan 12-lipoksigenase dapat ditemukan terutama pada sel luteal besar. Pewarnaan positif

pada kedua enzim meningkat dari fase luteal awal sampai akhir (Marks and Fürstenberger, 1999).

Oleh karena itu, tampak bahwa regulasi dan umur korpus luteum mungkin melibatkan produksi lokal prostaglandin luteotropik dan luteolitik serta interaksi dengan faktor regulasi parakrin lainnya (Marks and Fürstenberger, 1999).

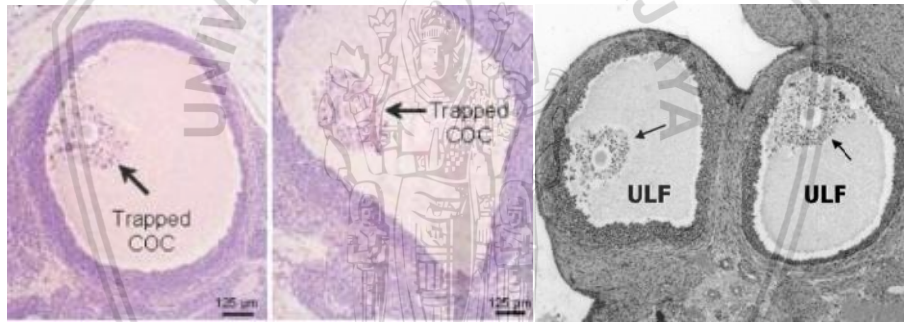
2.5 Gambaran Folikel Anovuloir Akibat Paparan Antiinflamasi

2.5.1 *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF)

Luteinized Unruptured Follicle (LUF) disebut juga sebagai *Hemorrhagic Anovulatory Follicle* (HAF) (Bashir *et al.*, 2016). LUF ini adalah salah satu penyebab dari infertilitas (Martínez-Boví and Cuervo-Arango, 2014). Pada beberapa orang tertentu, oosit dapat tetap tertahan setelah adanya LH surge. Keadaan ini disebut LUF syndrome (Magowan *et al.*, 2014). Etiologi dari LUF ini masih belum dapat dijelaskan secara pasti. Keadaan seperti lemahnya LH surge, tidak adanya kenaikan hormon progesteron sebelum ovulasi, dan abnormalitas dari sintesis prostaglandin diperkirakan menjadi penyebab dari keadaan LUF ini (Kurjak and Arenas, 2005). Selama perkembangan dari LUF, folikel preovulatori yang telah memenuhi syarat ukuran untuk ovulasi, tetap gagal melakukan ovulasi walaupun terdapat beberapa tanda khas yang terkait dengan ovulasi seperti adanya LH surge, penurunan estradiol secara mendadak dan peningkatan konsentrasi progesteron secara perlahan, penurunan edema endometrium, dan lama fase diestrus yang berlangsung normal (Martínez-Boví and Cuervo-Arango, 2014).

LUF gagal mengalami ruptur, namun mengalami peningkatan diameter. Selain diameternya yang lebih besar, karakteristik lainnya dari LUF yaitu dinding

folikel yang menebal dan menjadi lebih *echoic* atau lebih terang pada hasil pemeriksaan *Ultrasonography (USG)*, adanya proses luteinisasi yang aktif, dan adanya perdarahan pada antrum akibat kegagalan ovulasi. Baru-baru ini, beberapa penelitian yang dilakukan untuk menginduksi adanya LUF dengan memberikan inhibitor prostaglandin pada kuda dinyatakan telah berhasil dilakukan pada kuda, sedangkan sampel yang diberikan prostaglandin sama sekali tidak memunculkan adanya LUF (Martínez-Boví *and* Cuervo-Arango, 2014; Bashir *et al.*, 2016). Penelitian pada tikus yang dipapar indometasin, yaitu inhibitor COX-2 juga berhasil memunculkan adanya LUF yang mengarah pada infertilitas sekunder (Gaytán *et al.*, 2003).



Gambar 2.15 Luteinized Unruptured Follicle (LUF) (Gaytán *et al.*, 2003, 2006)
Keterangan: *Unruptured Luteinized Follicle (LUF)*, *Cumulus-Oocyte Complex* yang terjebak dalam LUF (*Trapped COC*)

2.5.2 *Cumulus-Oocyte Complex (COC)*

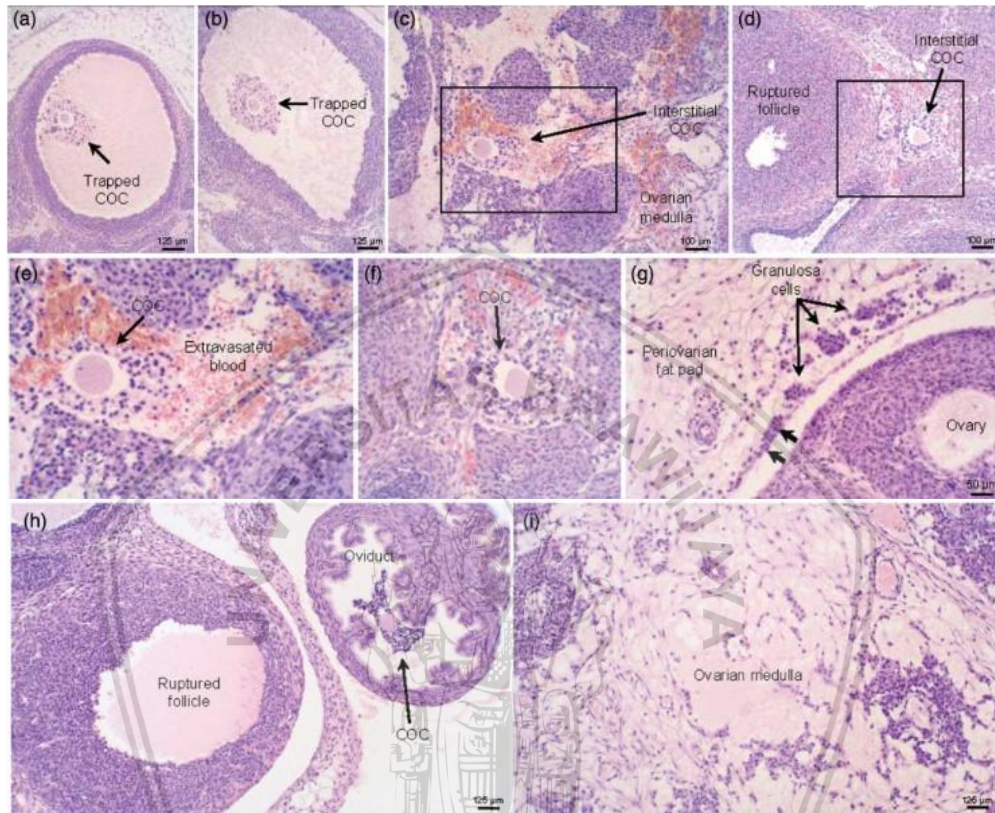
Sebelum adanya LH *surge*, dalam folikel preovulatori terdapat oosit yang dikelilingi oleh sel *cumulus* dan dipisahkan dari sel granulosa bagian mural oleh kavum yang berisi cairan folikel yang disebut antrum. Sel *cumulus* yang mengelilingi oosit ini disebut sebagai *cumulus oophorus* yaitu kumpulan sel yang memisahkan oosit dan cairan folikel. Gabungan oosit dan *cumulus oophorus* ini disebut sebagai *Cumulus-Oocyte Complex (COC)* (Lowe *and* Anderson, 2015; Strauss *et al.*, 2014). Setelah adanya LH *surge*, sel *cumulus* ini mengalami

perluasan dan menjadi tertanam pada sebuah matriks yang kaya akan hialuronan, lalu COC ini akan tertekan dan menembus folikel (Strauss *et al.*, 2014).

Di bawah pengaruh hormon gonadotropin, folikel antral diseleksi untuk mengalami diferensiasi, ovulasi, dan luteinisasi untuk membentuk korpus luteum. Saat adanya antrum, folikel preovulatori terdiri dari dua populasi independen dari sel granulosa, yaitu sel granulosa bagian mural yang berbatasan dengan dinding folikel dan sel granulosa yang dekat dengan sel teka dan pembuluh darah, sementara sel *cumulus* mengelilingi oosit dan berhubungan langsung dengan fungsi oosit tersebut. Kontribusi dari *growth factor* terhadap sel mural dan sel *cumulus* dan kaitannya dengan ovulasi sangat jelas pada saat LH surge. Reseptor LH terekspresi pada sel granulosa bagian mural yang memberikan respon terhadap LH surge yang menginisiasi adanya maturasi oosit, ekspansi sel *cumulus*, ruptur folikel, dan luteinisasi untuk membentuk korpus luteum. *Prostaglandin synthase 2* adalah salah satu faktor yang menstimulasi beberapa kejadian tersebut setelah adanya LH surge (Strauss *et al.*, 2014).

Pada beberapa studi, tidak semua kondisi COC ini dalam keadaan normal. Beberapa penelitian yang menggunakan hewan coba yaitu tikus, paparan inhibitor COX menyebabkan sebagian COC ini terjebak dalam LUF dan tetap berada pada tahap metafase II. Selain itu, sebagian COC lainnya berada pada bagian interstitial ovarium akibat ovulasi yang abnormal yaitu pada sisi basolateral sehingga tampak adanya perdarahan di sekitar sel lutein yang mengelilingi COC yang ada di interstitial. COC dengan ovulasi yang abnormal ini juga dapat terletak di ruang periovarium. Namun, sebagian kecil COC yaitu sekitar 16% saja mengalami ovulasi yang normal yaitu melalui sisi apikal dan

berada pada tuba falopi setelah mengalami ovulasi. Hal ini juga mengarah pada infertilitas akibat terjadinya ovulasi yang abnormal (Gaytán *et al.*, 2002, 2003).



Gambar 2.16 Cumulus-Oocyte Complex (COC) (Gaytán *et al.*, 2006)

Keterangan: COC yang terjebak dalam LUF (a, b), COC yang dilepaskan pada bagian interstitial ovarium (c, d; diperbesar pada gambar e, f), invasi sel granulosal pada periovarium (g), ovulasi normal dan lokasi COC berada pada tuba falopi (h), seperti halnya perluasan oedema pada medula ovarium. Pewarnaan menggunakan *Hematoxylin-Eosin*.

2.6 Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

Tikus merupakan rodentia, anggota dari famili yang terluas dari mamalia.

Taksonomi tikus (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

- Kingdom : *Animalia*
- Filum : *Chordata*
- Subfilum : *Vertebrata*
- Kelas : *Mamalia*

- Ordo : *Rodentia*
- Famili : *Muridae*
- Genus : *Rattus*
- Species : *Rattus norvegicus* (Suckow *et al.*, 2006)

Nama wistar diambil dari nama penemu tikus laboratorium ini yaitu Caspar Wistar (Suckow *et al.*, 2006). Tikus ini mempunyai kapasitas reproduksi yang tinggi, waktu reproduksi yang pendek, mudah dirawat dan dikondisikan, serta mempunyai kesamaan pada seluruh organ dengan manusia yang fungsinya serupa (Bogdanske *et al.*, 2010).

2.7 Siklus Estrus Tikus

Terdapat dua jenis siklus reproduksi yang berbeda pada mamalia betina. siklus menstruasi dimiliki oleh manusia dan banyak primata lain, sedangkan siklus estrus oleh mamalia lain. Pada kedua siklus ini terjadi ovulasi pada suatu fase dalam siklus setelah penebalan endometrium dan vaskularisasi endometrium untuk persiapan implantasi embrio. Letak perbedaan antara kedua siklus ini adalah pada keadaan endometrium saat pada uterus tidak terjadi implantasi embrio. Pada siklus menstruasi akan terjadi peluruhan endometrium dari uterus dan serviks kemudian terjadi perdarahan. Perdarahan tersebut disebut sebagai menstruasi. Sedangkan pada siklus estrus, endometrium yang seharusnya meluruh ini akan direabsorpsi (diserap kembali) oleh uterus sehingga tidak terjadi banyak perdarahan. Selain perbedaan keadaan endometrium, terdapat perbedaan perilaku. Perilaku terlihat lebih jelas pada siklus estrus daripada siklus menstruasi, dan juga terdapat pengaruh yang lebih kuat pada musim dan iklim. Seorang manusia dengan jenis kelamin perempuan dapat

bersifat reseptif terhadap aktivitas seksual pada semua fase siklus menstruasi, sedangkan mamalia betina hanya akan melakukan kopulasi pada fase sekitar ovulasi (Campbell *et al.*, 2004)

Rata-rata siklus estrus dari tikus adalah 4-5 hari. Siklus ini terdiri dari 4 tahap, yaitu fase proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Fluktuasi hormon yang diatur oleh gonadotropin yang disekresikan oleh pituitari anterior membuat perubahan pada ovarium dan folikel. Hal tersebut dapat dideteksi dengan sitologi vagina. Profil LH menunjukkan fluktuasi denyutan. Frekuensi yang tertinggi terjadi selama proestrus dan terendah selama fase estrus. Masing-masing *pulse* pada LH berkorelasi dengan *pulse* pada GnRH. LH *surge* pada fase proestrus menstimulasi ovulasi pada folikel *de Graaf* (Suckow *et al.*, 2006).

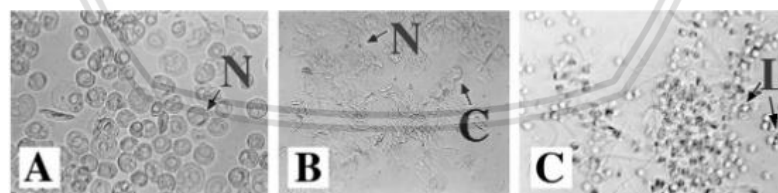
Peningkatan FSH menstimulasi perkembangan folikel. Kenaikan FSH yang pertama mempunyai korelasi dengan LH *surge*, dan yang kedua berkaitan dengan penurunan inhibin setelah ovulasi. Selama fase metestrus, korpus luteum mensekresi progesteron, dan progesteron ini menurun saat fase diestrus. Pada saat diestrus pula, perkembangan folikel terkait dengan peningkatan 17 - estradiol. Kadar estrogen memuncak selama proestrus yang akan menstimulasi LH yang memicu terjadinya ovulasi (Suckow *et al.*, 2006).

Pemeriksaan morfologi seluler vagina menggunakan metode *swab* vagina (*vaginal smear*) adalah metode yang telah digunakan secara meluas untuk mendeteksi tahapan dalam siklus estrus. Identifikasi fase yang akurat tergantung pada *swab* yang dilakukan pada saat yang tepat. Sel epitel berinti merupakan karakteristik dari fase proestrus yang lamanya sekitar 12 jam. Sedangkan selama fase estrus terdapat 75% sel berinti dan 25% sel bertanduk. Pada akhir fase estrus, sel bertanduk mengalami degenerasi dan mungkin muncul untuk

membentuk epitel. Metestrus terjadi setelah ovulasi selama \pm 21 jam. Kondisi sitologi vagina selama fase metestrus terdiri dari banyak leukosit dengan sel berinti dan sel bertanduk. Fase diestrus adalah fase yang terpanjang yaitu selama 57 jam, dan pada *swab* vagina terutama mengandung leukosit (Suckow *et al.*, 2006).

Tabel 2.2 Sitologi Vagina dan Perilaku selama Siklus Estrus (Suckow *et al.*, 2006)

Fase	Durasi (jam)	Perilaku	Morfologi <i>swab</i> vagina
Proestrus	12	Penerimaan jantan pada akhir fase	Sel epitel berinti
Estrus	12	Lordosis, penerimaan jantan	75% sel berinti, 25% sel bertanduk
Metestrus	21	Tidak ada penerimaan jantan	Beberapa leukosit dengan sel berinti dan bertanduk
Diestrus	57	Tidak ada penerimaan jantan	Leukosit



Gambar 2.17 Deteksi *Swab* Vagina pada Siklus Estrus Tikus (Suckow *et al.*, 2006)

Keterangan: Kotak A menunjukkan *swab* vagina selama proestrus, kotak B menunjukkan *swab* vagina selama fase estrus, dan kotak C menunjukkan *swab* vagina selama diestrus. Perbesaran pada gambar 200x. N = sel berinti; C = sel bertanduk; L = leukosit.

2.8 Anatomi Reproduksi Tikus

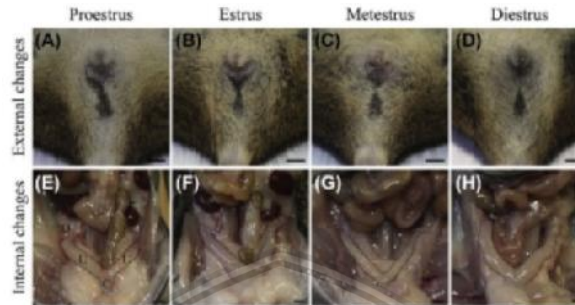
2.8.1 Makroanatomi Reproduksi Tikus

Tikus laboratorium mempunyai morfologi reproduksi dengan tipe bilateral. Ovarium terletak pada lemak subrenal. Uterus bikornu terhubung dengan introitus vagina. Suplai darah ovarium berasal dari arteri *ovarica* yang bercabang dari aorta desenden. Sedangkan suplai darah dari uterus berasal dari arteri *uterina* yang merupakan cabang dari arteri *ovarica* yang berasal dari arteri *iliaca* interna (Croy *et al.*, 2014).

Pada ujung anterior dari tuba falopi tikus membentuk sebuah lapisan yang membungkus ovarium yang dapat menjamin bahwa produk dari ovulasi akan langsung menuju ke uterus. Tuba falopi adalah sebuah lilitan yang terdapat sekita 11 tikungan dan ketika direntangkan hingga tidak ada gulungan akan mencapai panjang 1,8 cm. Tuba falopi terdiri dari infundibulum yaitu sebuah komponen yang menerima oosit, *ampulla* tempat terjadinya fertilisasi, dan *isthmus* tempat terhubungnya uterus dan tuba falopi. Tuba falopi dan uterus berasal dari duktus Mulleri yang membentuk struktur mukosa, otot, dan lapisan adventisia sampai ke serviks. Semua organ ini bersifat sensitif terhadap hormon baik lokal maupun sistemik sehingga dapat mengalami perubahan selama siklus estrus (Croy *et al.*, 2014).

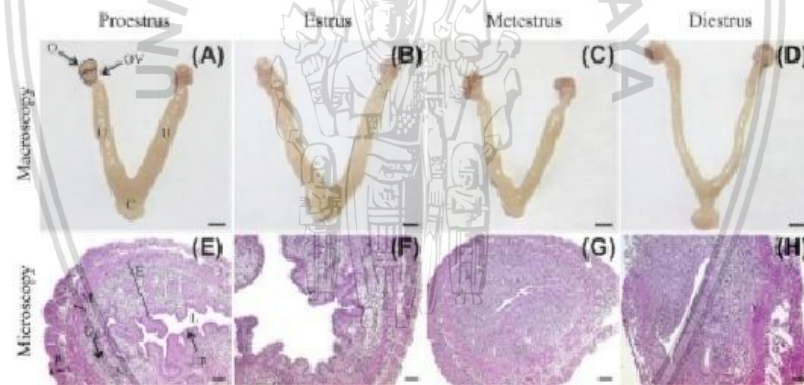
Serviks merupakan ujung uterus yang membuka. Struktur ini berlanjut ke struktur vagina yang terdiri dari struktur trilaminar dari *inner* mukosa, lapisan otot polos, dan adventisia luar. Pada tikus dewasa, mukosa vagina terdiri dari epitel skuamosa berlapis. Epitel dan sistem retikuloendotelial sel akan mengalami perubahan akibat variasi hormonal selama siklus estrus. Vagina dilindungi oleh

vulva, yaitu organ genitalia eksternal. Regio ini akan menunjukkan perubahan morfologi selama siklus estrus (Croy *et al.*, 2014).



Gambar 2.18 Manifestasi Makroanatomi pada Siklus Estrus Tikus C57BL/6-129 (Croy *et al.*, 2014)

Keterangan: A-D: perubahan pada *vaginal opening* sepanjang siklus yang ditandai dengan pembengkakan vulva dan tepi bibir vulva yang berdekatan. E-H: perubahan alat reproduksi interna pada tikus (O: ovarium, U: uterus, dan C: serviks)



Gambar 2.19 Makroskopi dan Mikroskopi Uterus selama Siklus Estrus (Croy *et al.*, 2014)

Keterangan: A-D: Traktus reproduksi internal tikus betina, O = ovarium, OV = tuba falopi, U = Uterus, dan C = Serviks. E-H: gambar mikroskopi dari histologi endometrium selama siklus estrus, P = Perimetrium, M = Miometrium, E = Endometrium, L = Lumen, Ep = Epitel endometrium, St = kompartemen stroma, Ug = kelenjar uterus.

2.8.2 Mikroanatomi Reproduksi Tikus dan Perkembangan Ovarium

Ovarium janin tikus mulai berkembang sekitar hari ke 9,5 setelah kopulasi. Sel somatic berkembang dari mesonefron embrionik dan epitel *coelomic*, serta gonad primitif mulai berkembang hari ke-10. Sel germinal primordial yang akan berkembang menjadi oosit, berdiferensiasi pada dasar *allantois* sekitar hari ke-

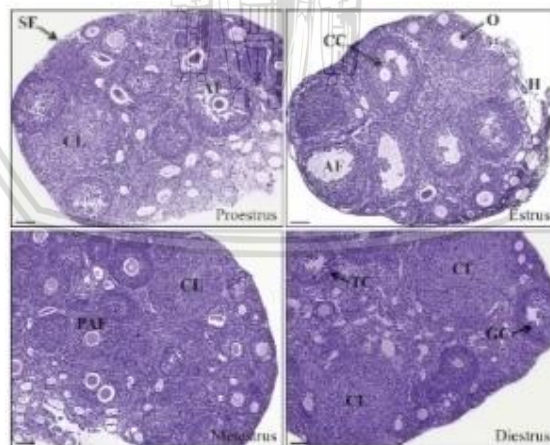
7,5 pasca kopulasi dan bermigrasi menuju *genital ridge* sekitar hari ke-9,5 setelah kopulasi. Antara hari ke-10,5 dan 13,5 pasca kopulasi, oosit pada tikus mengalami pembelahan mitosis. Oogonium kemudian memulai proses meiosis dan masuk ke tahap profase. Proses dari meiosis ini terhenti sampai oosit dan komponen folikel somatis direkrut ke dalam tempat perkembangan folikel.

Folikel akan melalui berbagai tahap perkembangan berdasarkan karakteristik morfologinya. Folikel primordial muncul 1-2 hari setelah kelahiran, ketika sel pregranulosa skuamous mengelilingi oosit. Folikel dengan selapis sel yang berubah dari sel skuamosa ke sel kuboidal terjadi pada tiga hari pasca kelahiran disebut folikel primer. Folikel sekunder berubah dari folikel primer dengan dua lapisan atau lebih namun tidak terdapat antrum. Pada hari ke-7, folikel primordial merupakan folikel yang paling banyak. Sedangkan folikel primer dan sekunder yang memiliki selapis sel granulosa atau lebih dan terdapat lapisan teka, terdapat pada medula ovarium. Folikel antral pertama pada tikus ada pada hari ke-13 pasca kelahiran. Pada hari ke-21, sel granulosa yang berlapis-lapis yang mengandung cairan interstitial yang tersebar mengelilingi oosit. Folikel preovulatori mengandung *cumulus oophorus*, yaitu sel granulosa berlapis yang mengelilingi oosit yang memisahkan oosit dari cairan antrum. Ovulasi pertama pada tikus terjadi antara hari ke-30 dan 40 pasca kelahiran (Croy *et al.*, 2014).

Ovarium pada tikus dewasa yang telah mengalami siklus estrus tertutup oleh sel epitel yang berasal dari peritoneum. Masuk dan keluarnya vaskularisasi yaitu melalui hilus ovarium yang merupakan korteks ovarium. Sebagian besar folikel merupakan jenis folikel primordial yang terletak di tepi medula. Penghitungan folikel pada tikus C57BL/6, menunjukkan bahwa terdapat sekitar 8000 folikel primordial saat lahir dan turun sampai sekitar 2500 pada hari ke-7

pasca kelahiran yang banyak disebabkan karena kematian oosit. Folikel yang bertransisi dari folikel primordial sebagian kecil akan berkembang sampai mengalami ovulasi, dan sebagian besar akan mengalami atresia, dan dapat diestimasikan bahwa 3 dari 6 folikel primordial setiap harinya akan masuk ke tahap perkembangan selanjutnya. Tahap ini membutuhkan waktu sekitar 16 hari untuk mencapai folikel preovulatori. Folikel paling banyak mengalami atresia pada tahap preantral dan antral awal (Croy *et al.*, 2014).

Interaksi jaringan antara oosit, sel granulosa, sel teka, hipofisis, dan hipotalamus berperan dalam proses ovulasi. Setelah ovulasi, folikel mengalami reorganisasi yang masif. Elemen dari teka vaskular mengalami invasi dan membawa sel teka dan sel granulosa untuk membentuk korpus luteum. Jika tidak terjadi fertilisasi, maka korpus luteum akan mengalami regresi dan terjadinya penurunan progesteron yang menyebabkan terjadinya siklus selanjutnya (Croy *et al.*, 2014).



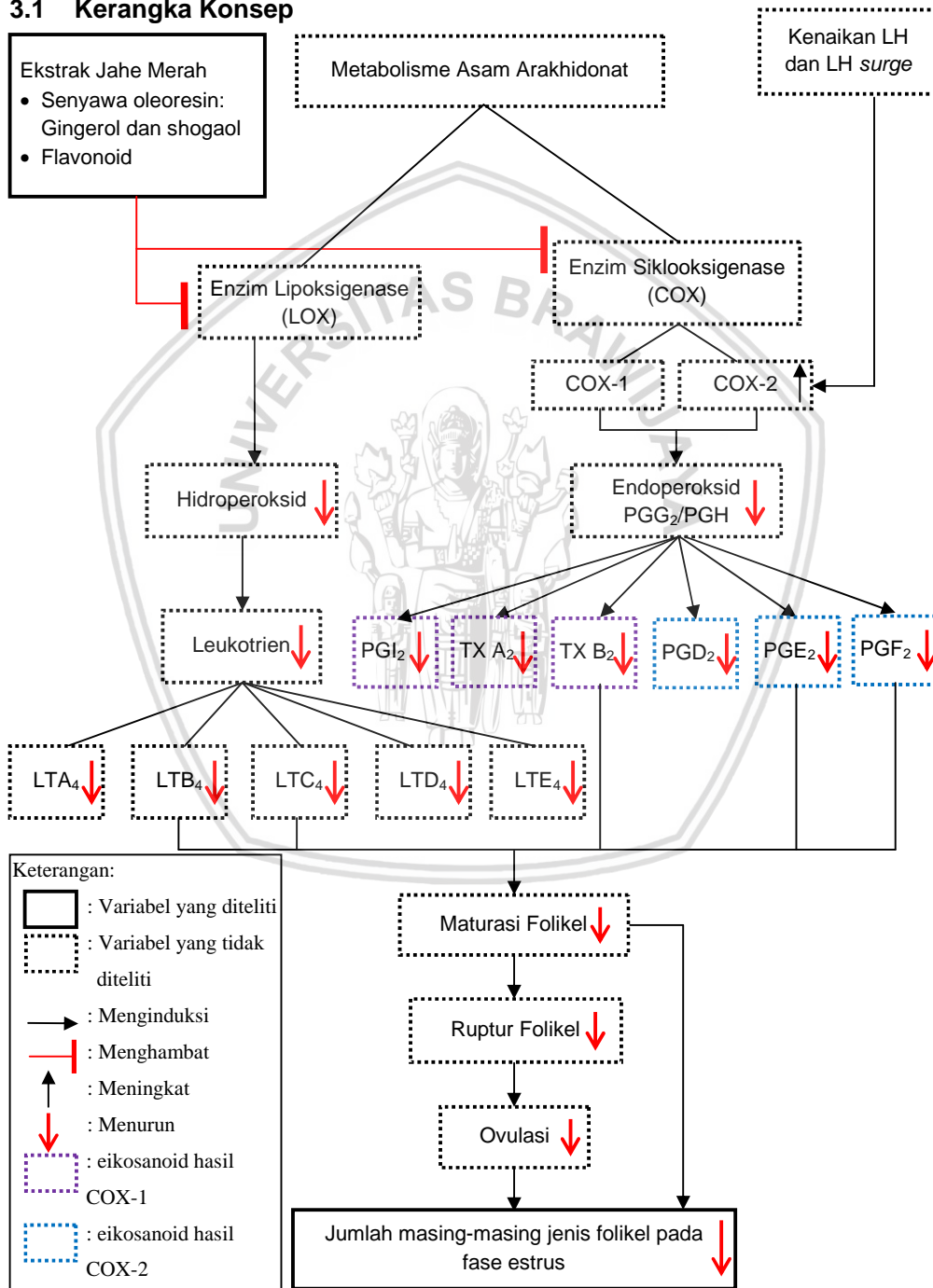
Gambar 2.20 Penampang Mikroskopi Ovarium Tikus yang Diberi *Hematoxylin-Eosin* selama Siklus Estrus (Croy *et al.*, 2014)

Keterangan: SE = Epitel permukaan, O = Oosit, CL = Korpus luteum, AF = Folikel antral, CC = Sel *cumulus*, H = Hilus, PAF = Folikel preantral, TC = Sel teka, GC = Sel granulosa.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Setiap terjadinya kenaikan LH dan LH surge dalam siklus estrus akan memicu peningkatan produksi COX-2 yang akan memicu peningkatan metabolisme asam arakidonat melalui aktivasi protease, neovaskularisasi, migrasi leukosit, dan kontaksi otot polos (Marks and Fürstenberger, 1999; Akpantah, 2005). COX adalah salah satu enzim pada metabolisme asam arakidonat. Terdapat 2 jalur metabolisme asam arakidonat, yaitu jalur siklooksigenase (COX) dan lipoksigenase (LOX). COX mempunyai 2 isomer, yaitu COX-1 dan COX-2. Metabolisme jalur COX akan menghasilkan endoperoksid (PGG_2/PGH) yang kemudian akan dikonversi menjadi prostaglandin (PG) untuk hasil metabolisme oleh COX-2, tromboksan (TX) dan prostasiklin (PGI_2) untuk hasil metabolisme oleh COX-1. Berbagai prostaglandin diproduksi oleh berbagai sel seperti monosit dan makrofag yang menghasilkan sejumlah PGE_2 dan PGF_2 ; neutrofil yang menghasilkan PGE_2 dalam jumlah sedang; dan sel mast yang menghasilkan PGD_2 . Prostaglandin akan meningkatkan permeabilitas vaskular, mendilatasi vaskular, serta menginduksi kemotaksis neutrofil. Sedangkan tromboksan (TX) akan mengkontraksikan pembuluh darah dan agregasi trombosit (Baratawijaya dan Rengganis, 2010).

Cairan folikel pada manusia mengandung prostaglandin F_2 (PGF_2), 6-keto- PGF_1 , PGE_2 , tromboksan B_2 (TXB_2), leukotrien B_4 (LTB_4), dan leukotrien C_4 (LTC_4). PGF_2 dan PGE_2 merupakan prostaglandin yang berperan penting dalam proses rupturnya folikel. PGE_2 akan menginduksi pematangan oosit, meningkatkan aliran darah lokal dan permeabilitas vaskular, serta menyebabkan edema lokal yang mendahului ovulasi. Sedangkan PGF_2 akan menginduksi proteolisis dan berperan dalam proses kolagenolisis. PGF_2 juga berperan

meningkatkan kontraktilitas ovarium dan sebagai antagonis PGE_2 yang menginduksi hiperemia (*PGE₂-induced hyperemia*). PGE_2 juga dapat diubah menjadi PGF_2 oleh tingginya kadar enzim PGE_2 -9-keto-reduktase pada sebagian besar spesies yang mungkin juga terkait secara signifikan dengan ovulasi (Marks *and* Fürstenberger, 1999).

Asam arakidonat (AA) juga dimetabolisme melalui jalur lipoksigenase dengan menggunakan enzim lipoksigenase (LOX) yang menghasilkan 4 Leukotrien (LT) yaitu LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , dan LTE_4 (Baratawijaya dan Rengganis, 2010). Leukotrien yang terdapat di folikel adalah LTB_4 dan LTC_4 (Marks *and* Fürstenberger, 1999). LTC_4 berperan menginduksi kontraksi otot polos, dan LTB_4 merupakan kemoatraktan poten untuk neutrofil. LT ini diproduksi oleh berbagai sel yaitu monosit, makrofag, dan sel mast (Baratawijaya dan Rengganis, 2010). Sintesis LTB_4 meningkat dengan cepat setelah pemberian *human chorionic gonadotropin* (hCG), dan mencapai puncaknya dengan baik sebelum PGE_2 dan PGF_2 mencapai puncak. LTB_4 ini dapat menyebabkan kemotaksis dari leukosit dan kemudian merangsang pelepasan lisozim. LTC_4 menunjukkan puncak pertamanya pada awal dan yang kedua beberapa jam setelah stimulasi gonadotropin (Marks *and* Fürstenberger, 1999). LTB_4 dan LTC_4 ini meningkat selama periode ovulasi dan inhibitor dari reseptor LTB_4 ini dapat menghambat ovulasi sehingga diperkirakan kedua leukotrien ini berperan dalam proses ovulasi (Higuchi, *et al.*, 1995; Knight, 2014).

Selain itu, dalam cairan folikel juga terdapat TXB_2 (Marks *and* Fürstenberger, 1999). Konsentrasi dari TXB_2 pada dinding folikel dan pada cairan folikel meningkat secara drastis pada folikel preovulatori (Murdoch, 1986; B *dis et al.*, 2014). TXB_2 merupakan metabolit stabil dari TXA_2 (Leung *and* Adashi,

2004). Agregasi dari platelet yang diperkirakan bersumber dari TXA₂ melekat pada sel endotel kapiler pada folikel preovulatori dan penggumpalan pada intravaskular dan ekstrasvaskular terjadi secara nyata sehingga diperkirakan platelet dan tromboksan berperan dalam proses maturasi folikel (B dis *et al.*, 2014).

Jahe merah memiliki berbagai kandungan antiinflamasi. Beberapa kandungan diantaranya adalah gingerol, shogaol, dan flavonoid. Gingerol dan shogaol memiliki efek yang kuat dalam menghambat biosintesis prostaglandin (Achmad, 2008). Gingerol dan shogaol menghambat metabolisme asam arakidonat dengan cara menghambat COX dan LOX. Flavonoid juga dapat menghambat metabolisme asam arakidonat dengan cara menghambat sisi aktif dari peroksidase COX-1, COX-2, dan 5-LOX. Ketika COX dan LOX dihambat oleh berbagai kandungan dalam ekstrak jahe merah, maka produksi prostaglandin, tromboksan, dan leukotrien yang berperan penting dalam ovulasi akan menurun sehingga dapat diperkirakan akan terjadi penurunan kejadian ruptur folikel dan penurunan jumlah folikel pada ovarium tikus saat fase estrus.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis Penelitian ini adalah pemberian ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) dapat menurunkan jumlah folikel pada ovarium tikus putih strain wistar betina (*Rattus norvegicus*).

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (*pure experimental design*) yang dilakukan secara *in vivo* yaitu di laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang berbeda pada setiap sampel penelitian dan membandingkannya terhadap kelompok kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Identifikasi dan Jumlah Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang berjenis kelamin betina. Berat tikus putih yang digunakan sekitar 150-200 gram dengan usia sekitar 8 minggu sampai 12 minggu. Sebelum diberi perlakuan, tikus-tikus ini dilakukan *swab* vagina terlebih dahulu dan dilihat hasil apusan vaginanya menggunakan mikroskop cahaya untuk mengetahui siklus estrus pada masing-masing tikus. *Swab* vagina ini dilakukan setiap hari selama 10 hari untuk mengetahui siklus estrus tikus selama 2 siklus berturut-turut (Akpantah *et al.*, 2005). Tikus yang akan digunakan dalam penelitian adalah tikus dengan siklus estrus normal, yaitu 4-5 hari. Tikus tersebut dibagi menjadi 4 kelompok sampel, yaitu:

1. Kelompok kontrol : sampel yang hanya diberikan pakan standar (normal) dan minum secara *ad libitum*.
2. Kelompok I : sampel yang diberi ekstrak jahe merah dengan dosis 0,3 gr/kgBB/hari secara oral selama 3 siklus.
3. Kelompok II : sampel yang diberi ekstrak jahe merah dengan dosis 0,6 gr/kgBB/hari secara oral dimulai dari selama 3 siklus.
4. Kelompok III : sampel yang diberi ekstrak jahe merah dengan dosis 1,2 gr/kgBB/hari secara oral selama 3 siklus.

Berbagai dosis tersebut diambil dari penelitian Lestari (2002) mengenai pengaruh pemberian ekstrak jahe sebagai analgesik dan antiinflamasi pada tikus strain wistar yang memberikan hasil signifikan pada ketiga dosis tersebut pada menit ke-60 pemberian perlakuan dan onset pada menit ke-30. Dalam penelitian tersebut juga dinyatakan bahwa dosis jahe minimal yang dapat memberikan efek antiinflamasi adalah 0,9 gr/kgBB/hari.

Penelitian Lestari (2002) menggunakan 3 dosis yang berbeda yaitu 0,9 gr/kgBB/hari, 1,8 gr/kgBB/hari, dan 3,6 gr/kgBB/hari yang ketiganya memberikan hasil yang signifikan. Peneliti menggunakan 3 dosis yang berbeda juga yang mengacu pada penelitian Lestari (2002) tersebut, namun peneliti membagi dosisnya menjadi 3 karena pemberian dosis tersebut dilakukan selama 3 siklus estrus.

Perhitungan jumlah besar sampel yang digunakan dengan perlakuan (p) = 4 menggunakan rumus sebagai berikut:

$p(n - 1)$	15	(Solimun, 2002)
$4(n - 1)$	15	
$4n - 4$	15	

4n	19
n	4.75

Dari hasil perhitungan tersebut, maka ditemukan jumlah replikasi sebesar 4.75 sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 5 ekor tikus untuk setiap kelompok perlakuan. Untuk menghindari risiko penurunan jumlah sampel akibat kematian sebesar 20% dan siklus estrus yang tidak teratur sebanyak 20%, maka pengulangan diperbanyak menjadi $n + 2$ yaitu 7 ekor di setiap kelompok perlakuan sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi 28 ekor.

4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a) Kriteria Inklusi

- 1) Jenis Tikus : *Rattus norvegicus* galur wistar
- 2) Jenis kelamin tikus : Betina
- 3) Umur tikus : $\pm 8 - 12$ minggu
- 4) Berat badan tikus : $\pm 150 - 200$ gram
- 5) Tikus yang sehat
- 6) Siklus estrus tikus normal selama 2 siklus berturut-turut (4-5 hari setiap siklusnya) yang diketahui dari hasil *swab* vagina tikus setiap harinya.

b) Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus yang selama proses penelitian tidak mau makan atau tiba-tiba mati.
- 2) Tikus yang selama proses adaptasi di laboratorium mengalami penurunan berat badan $> 10\%$.

- 3) Tikus yang mengalami obesitas selama penelitian (indeks obesitas $Lee > 0,3$) (Campos *et al.*, 2008; Hermawan *et al.*, 2011).

$$\text{Indeks Obesitas } Lee = \frac{\sqrt{\text{Berat Badan (gram)} \times 10}}{\text{Panjang Nasoanal (mm)}}$$

- 4) Tikus yang diketahui hamil selama penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jumlah folikel ovarium tikus strain wistar yang diberi ekstrak jahe merah dengan 3 dosis yang berbeda.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian eksperimental ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya antara bulan September - November 2017. Sedangkan untuk proses pengambilan data dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan dan Alat Pembuatan Ekstrak Jahe Merah

Menurut standar ekstraksi Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, alat dan bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak jahe merah adalah sebagai berikut:

- a) Jahe merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari Batu Materia Medika.
- b) Etanol 96%
- c) Aquades
- d) Botol hasil ekstrak
- e) Oven
- f) Gelas Erlenmeyer
- g) Timbangan
- h) Corongan gelas
- i) Kertas saring (berukuran 30 mesh)
- j) Labu evaporator
- k) Labu penampung etanol
- l) Evaporator
- m) Pendingin spiral/*rotary evaporator*
- n) Selang *water pump*
- o) *Water pump*
- p) *Water bath*
- q) *Vacuum pump*
- r) *Freezer*

4.5.2 Bahan dan Alat Pengamatan Siklus Estrus Tikus

Alat dan bahan yang digunakan untuk pengamatan siklus estrus tikus adalah sebagai berikut:

- a) Alat: *cotton bud*, mikroskop cahaya, *object glass*, dan *cover glass*.
- b) Bahan: NaCl 0,9%, tikus strain wistar, alkohol, dan *giemsa*.

4.5.3 Bahan dan Alat Pengambilan Organ

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembedahan dan pengambilan organ tikus yaitu sebagai berikut:

- a) Alat: peralatan bedah minor, pinset, gunting, dan botol-botol tertutup untuk tempat organ tikus.
- b) Bahan: formalin 10%.

4.5.4 Bahan dan Alat Pengamatan Jumlah Folikel Ovarium Tikus

4.5.4.1 Bahan dan Alat Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

Alat dan bahan yang digunakan untuk pembuatan preparat histologi ovarium yaitu sebagai berikut:

- a) Alat: timbangan, pisau, pisau mikrotom, mikrotom geser, pinset skaple, *embedding cassette*, oven, cangkir logam, cetakan paraffin, balok kayu, kuas, *water bath*, inkubator, *stopwatch*, api gas, *tissue prosesor*, *object glass* dan *cover glass*, serta kertas label.
- b) Bahan: 20 ekor tikus putih strain wistar betina usia 8-12 minggu dengan berat 150-200 gram dan mempunyai siklus estrus normal selama 2 siklus, *aquabidest*, *kloroform*, cairan formaldehida 10%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolute, xylol, paraffin cair, *hematoxylin*, *eosin*, *entellan*.

4.5.4.2 Bahan dan Alat Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium

Alat yang digunakan untuk penghitungan jumlah folikel ovarium adalah mikroskop cahaya dan *scan dot slide*.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional pada Penelitian berdasarkan Satuan dan Skala

No.	Definisi Operasional	Satuan	Skala
1.	<p><i>Rattus norvegicus</i> strain wistar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) strain wistar yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, berjenis kelamin betina, usia 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, kondisi sehat, dan mempunyai siklus estrus normal yaitu 4-5 hari.</p>	Ekor	Rasio
2.	<p>Ekstrak Jahe Merah (<i>Zingiber officinale</i> var. <i>Rubrum</i>) Ekstrak jahe merah (<i>Zingiber officinale</i> var. <i>Rubrum</i>) adalah rimpang jahe merah yang telah dilakukan proses ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Jahe merah berupa serbuk diperoleh dari Batu Materia Medika dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Ekstrak tersebut kemudian dibagi menjadi beberapa dosis yaitu 0,3 gr/kgBB, 0,6 gr/kgBB, dan 1,2 gr/kgBB.</p>	gr/kgBB	Ordinal
3.	<p>Jumlah Folikel pada Ovarium Jumlah total folikel pada ovarium tikus yang terdiri dari folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier (Folikel <i>de Graaf</i>), dan korpus luteum pada awal fase estrus tikus setelah pemberian ekstrak jahe merah pada berbagai dosis (pada kelompok perlakuan) dan setelah pemberian aquadest dengan sonde lambung (pada kelompok kontrol) selama 3 siklus yang dilihat menggunakan mikroskop dan <i>scan dot slide</i> untuk memudahkan membaca slide yang diteliti. Setiap tikus yang telah memasuki fase estrus awal dilakukan pembedahan, diambil organ ovariumnya dan diberi pewarnaan menggunakan <i>Hematoxylin-Eosin</i> kemudian dibandingkan jumlah folikelnya antara masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.</p>	Buah	Rasio

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 7 hari. Aklimatisasi ini bertujuan untuk mengkondisikan hewan coba dengan suasana laboratorium dan untuk menghilangkan stress. Satu tikus diletakkan dalam satu kandang tikus berupa box plastik berukuran 30 x 30 x 12 cm masing-masing untuk 1 ekor tikus yang ditutup dengan kawat kasa yang diberi alas sekam. Alas sekam tersebut akan diganti setiap 3 hari sekali. Masing-masing kandang tikus dikondisikan dalam suasana gelap selama 12 jam, kemudian disinari cahaya selama 12 jam setiap harinya. Selama proses aklimatisasi, tikus diberi pakan standar dan minum setiap hari secara *ad libitum*.

4.7.2 Pengamatan Siklus Estrus Tikus

Pengamatan siklus estrus dilakukan dengan *swab* vagina menggunakan *cotton bud* yang telah dibasahi dengan NaCl 0,9% lalu diulaskan pada sel epitel vagina dan dilakukan pengusapan sebanyak 1-2 kali putaran untuk membuat preparat apusan. Pengamatan siklus estrus ini bertujuan untuk mengetahui panjang siklus estrus normal tikus yang menjadi kriteria inklusi penelitian dan untuk mengetahui waktu awal pemberian perlakuan dan waktu pembedahan yang akan dilakukan saat fase estrus sehingga dilakukan sebelum pemberian perlakuan dan selama pemberian perlakuan (pada siklus ke-2 dan ke-3 pemberian ekstrak jahe merah). Pengambilan sampel sitologi dilakukan 1 kali sehari pada pukul 08.00-09.00 setiap hari (Marcondes *et al.*, 2002). Adapun

prosedur pengambilan sampel sitologi dan pewarnaan preparat apusan vagina dalam Harlis (2014) adalah sebagai berikut.

1. Tikus dipegang dengan benar dan tidak terlalu kasar dengan menggunakan sarung tangan.
2. *Cotton bud* steril dibasahi dengan larutan NaCl 0,9% kemudian dimasukkan ke dalam lubang vagina tikus betina.
3. Dilakukan pengusapan sebanyak 1-2 kali putaran.
4. Hasil usapan dari *cotton bud* dioleskan pada kaca objek dan dikeringkan.
5. Pengambilan sampel apusan vagina dibuat sebanyak 1 preparat atau kaca objek untuk 1 ekor tikus.
6. Preparat apusan yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam larutan alkohol untuk difiksasi selama 3 menit kemudian diangkat dan diangin-anginkan.
7. Preparat dimasukkan ke dalam larutan *Giemsa* 3% selama 2 menit kemudian diangkat dan dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan.
8. Setelah preparat apusan siap, morfologi sel epitel apusan vagina diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X kemudian dilakukan pencatatan dan pendokumentasian.

4.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Setelah memperoleh 24 ekor tikus yang memiliki siklus estrus normal selama 2 siklus, selanjutnya sampel dibagi menjadi 4 kelompok dengan cara *simple random sampling* agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama.

4.7.4 Pemberian Tanda pada Hewan Coba

Pemberian tanda pada tikus dilakukan dengan cara memberikan kode huruf dan angka di setiap kandang tikus. Kode huruf digunakan sebagai pembeda kelompok perlakuan sedangkan kode angka digunakan sebagai pembeda tikus dalam satu kelompok pada masing-masing kelompok.

4.7.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Jahe Merah

4.7.5.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Jahe Merah

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen aktif dari suatu tanaman (dalam penelitian ini adalah tanaman jahe merah) dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan komponen aktifnya. Ekstraksi dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu ekstraksi dengan pelarut uap, ekstraksi dengan lemak dingin, dan ekstraksi dengan lemak panas. Untuk metode pembuatan ekstrak jahe merah dalam penelitian ini menggunakan metode ekstraksi dingin. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi dengan pelarut etanol 96% karena etanol dengan konsentrasi tersebut dapat memberikan hasil yang terbaik untuk memunculkan zat gingerol dan shogaol dalam jahe (Hu *et al.*, 2011). Proses ekstraksi jahe merah dengan metode ekstraksi dingin ini mengikuti standar di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang yang meliputi beberapa tahap sebagai berikut:

- a) Proses pengeringan
 1. Dicuci bersih rimpang jahe merah yang akan dikeringkan.
 2. Dipotong kecil-kecil.
 3. Di-oven dengan suhu 60⁰ - 80⁰C sampai kering (bebas kandungan air).
- b) Proses ekstraksi

1. Setelah kering, dihaluskan dengan blender sampai halus. Disaring dengan saringan ukuran 30 mesh.
 2. Ditimbang sampel kering (bubuk jahe merah) sebanyak 100 gram.
 3. Dimasukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
 4. Direndam dengan etanol sampai volume 900 ml.
 5. Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
 6. Didiamkan 3 - 4 malam sampai megendap.
- c) Proses evaporasi
1. Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil.
 2. Dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
 3. Dipasang labu evaporasi pada evaporator.
 4. Diisi *water bath* dengan air sampai penuh.
 5. Dipasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90°), dan disambungkan dengan aliran listrik.
 6. Dibiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
 7. Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ jam sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 ml.
 8. Hasil yang diperoleh kira-kira $1/7$ dari bahan alam kering.
 9. Dimasukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik/kaca.
 10. Disimpan dalam *freezer*.

4.7.5.2 Pemberian Ekstrak Jahe Merah

Pemberian ekstrak jahe merah ini dilakukan setiap hari selama 3 siklus estrus tikus, yaitu dimulai saat fase estrus dan diakhiri pada saat akhir fase proestrus. Pemberian ekstrak jahe merah diberikan per oral menggunakan sonde 2 kali sehari yaitu pada pukul 10.00 dan 14.00 dengan membagi dosis menjadi 2 bagian. Pemberian ekstrak jahe tersebut disesuaikan dengan naik turunnya LH pada tikus. LH mulai naik pada siang hari saat fase proestrus, yaitu sekitar pukul 14.00-15.00, dan mencapai puncaknya sekitar pukul 17.00-19.00. Terjadinya LH surge secara cepat ini menginduksi rupturnya folikel dan ovulasi. Ovulasi dapat dihambat secara eksperimen dengan obat antiinflamasi dosis tinggi sebelum terjadinya LH surge karena sekali terjadi kenaikan, maka kemungkinan tidak bisa dilakukan penghambatan oleh suatu obat (Gaytán *et al*, 2002).

Pada penelitian Akpantah (2005), pemberian ekstrak biji *Garcinia kola* terhadap jumlah oosit di tuba falopi, dilakukan pada pukul 10.00, 14.00, dan 18.00. Hasil penelitian signifikan pada pukul 10.00 dan 14.00, namun tidak signifikan pada pemberian pukul 18.00. Oleh karena itu, pemberian ekstrak jahe merah dalam penelitian ini dilakukan 2 kali sehari pada pukul 10.00 dan 14.00 selama 3 siklus dimulai dari fase estrus. Khusus untuk kelompok kontrol, diberikan perlakuan dengan memasukkan aquadest menggunakan sonde lambung. Selama pemberian perlakuan tetap dilakukan pemeriksaan apusan vagina pada setiap tikus untuk mengidentifikasi lama tiap fase estrus.

4.7.6 Prosedur Pengambilan Organ

Setelah diberi ekstrak jahe merah selama 3 siklus estrus, lalu saat dilakukan *swab vagina* pada pukul 09.00 telah diketahui bahwa tikus telah

memasuki fase estrus awal, dilakukan pembedahan oleh petugas Laboratorium Farmakologi dengan langkah sebagai berikut:

- 1) Tikus diterminasi dengan cara dislokasi *cervical*.
- 2) Tikus yang telah mati diletakkan pada alas papan dengan perut menghadap ke atas menggunakan paku payung yang ditancapkan pada empat telapak kaki tikus.
- 3) Dinding perut dibuka menggunakan pinset dan gunting dengan hati-hati, dilakukan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah, lalu diafragma dibuka.
- 4) Mencari ovarium kanan dan kiri tikus dengan hati-hati dan diambil lalu dipisahkan.
- 5) Hasil yang diperoleh dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan.
- 6) Ovarium kanan dan kiri tikus difiksasi dengan menggunakan formalin 10% dan dikirimkan ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk dibuat preparat histologi dan dilakukan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* lalu dilakukan penghitungan jumlah folikel.
- 7) Bangkai tikus yang tidak digunakan lagi dikubur oleh petugas laboratorium.

4.7.7 Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

Kedua ovarium tikus yaitu ovarium kanan dan kiri digunakan dan dipotong menjadi setengah bagian dari masing-masing ovarium (Balasubramanian *et al.*, 2012). Ovarium yang telah diperoleh diambil sampel secukupnya lalu dimasukkan ke dalam cairan formaldehida 10% untuk dibuat preparat histologis. Selanjutnya, dilakukan langkah-langkah pembuatan preparat histologis yang dilakukan oleh analis laboratorium sesuai dengan standar operasional prosedur

Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yaitu sebagai berikut:

- a. Proses pemotongan jaringan berupa macros
 - 1) Jaringan atau spesimen penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10% atau dengan *buffer* formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya
 - 2) Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan diteliti
 - 3) Jaringan dipotong kurang lebih dengan ketebalan 2-3 mm
 - 4) Dimasukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
 - 5) Jaringan kemudian diproses dengan alat *Automatic Tissue Tex Processor* atau dengan cara manual
 - 6) Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan *Automatic Tissue Tex Processor* selama 90 menit
 - 7) Alarm bunyi tanda selesai.
- b. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
 - 1) Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*
 - 2) Jaringan diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan
 - 3) Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron.
- c. Proses deparafinisasi
 - 1) Jaringan diletakkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas $70^{\circ} - 80^{\circ}\text{C}$
 - 2) Jaringan dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit
 - 3) Jaringan dimasukkan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit
 - 4) Jaringan dimasukkan air mengalir selama 15 menit.

- d. Proses pewarnaan (HE)
 - 1) Cat utama Harris Hematoksilin selama 10 - 15 menit
 - 2) Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
 - 3) Alkohol asam 1 % 2 - 5 celup
 - 4) Amonia lithium karbonat 3 - 5 celup (bila kurang biru)
 - 5) Eosin selama 10 - 15 menit.
- e. Alkohol bertingkat
 - 1) Alkohol 70% 3 menit
 - 2) Alkohol 80% 3 menit
 - 3) Alkohol 96% 3 menit
 - 4) Alkohol absolut 3 menit
- f. Penjernihan (*Clearing*)
 - 1) Xylol 15 menit
 - 2) Xylol 15 menit
- g. *Mounting* dengan entelan dan *deckglass*

Slide/objek glass ditutup dengan cover glass dan biarkan slide kering pada suhu ruangan. Setelah slide kering siap untuk diamati (Umami, 2014).

4.7.8 Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium

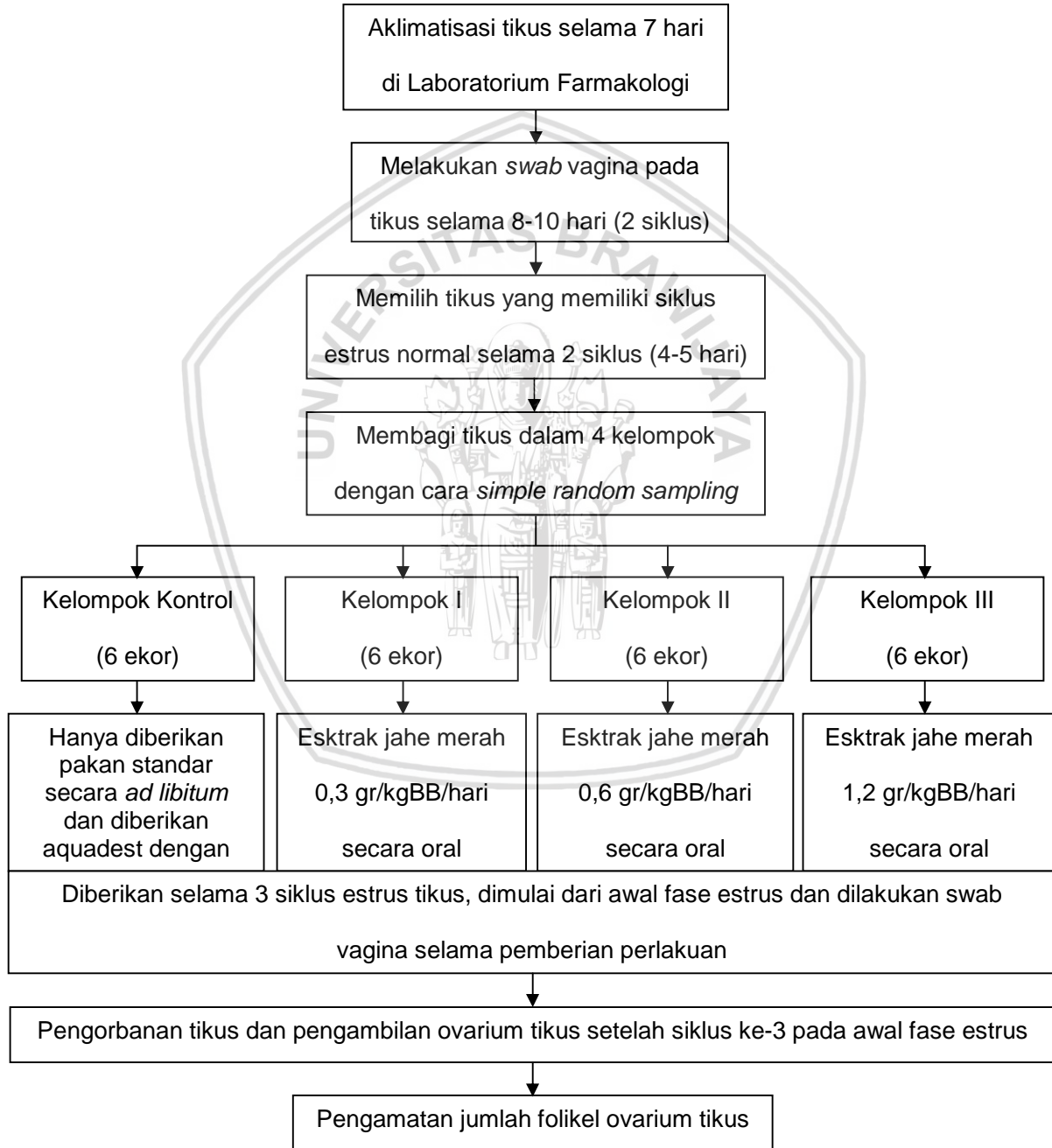
Setelah dilakukan proses pembuatan preparat histologi ovarium, selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap histologi ovarium. Pengamatan kuantitatif histologi ovarium dilakukan dengan cara menghitung berbagai komponen penting ovarium, meliputi folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier (folikel *de Graaf*), dan korpus luteum.

Penghitungan jumlah folikel ovarium ini diamati menggunakan mikroskop dan *scan dot slide*. Pengamatan ini dilakukan mulai dari perbesaran kecil yaitu 100x lalu dilanjutkan dengan perbesaran yang lebih besar yaitu 400x. Pengamatan ini dilakukan pada saat tikus mengalami fase estrus awal.



4.8 Alur Penelitian

Penelitian dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel pada ovarium tikus putih (*Rattus norvegicus*). Alur penelitian ini dapat dijelaskan melalui bagan sebagai berikut:



4.9 Analisis Data

Hasil pengamatan perhitungan jumlah folikel pada ovarium kanan dan kiri tikus strain wistar dianalisis secara sistematis dengan bantuan perangkat lunak (*software*) *SPSS for Windows* 20.0. Uji statistik dinyatakan terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) jika $p < 0.05$. Langkah-langkah analisis data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1) Uji normalitas data

Uji normalitas data bertujuan untuk menguji asumsi anova berlaku atau tidak. Pemilihan penyajian data dan uji hipotesa bergantung pada normal atau tidaknya suatu distribusi data. Dalam uji ini diketahui sebaran data normal pada data jumlah folikel dalam ovarium kanan dan kiri tikus strain wistar pada setiap kelompok perlakuan. Untuk pemusatan dan penyebaran data digunakan mean dan standar deviasi. Untuk uji hipotesis dapat menggunakan uji parametrik.

2) Uji homogenitas varian

Uji homogenitas varian dilakukan dengan tujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi anova. Asumsi anova terpenuhi jika varian dalam kelompok homogen.

3) Uji One-way Anova

Uji *Anova One Way* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol (tanpa pemberian ekstrak jahe merah) dengan kelompok perlakuan (dengan pemberian berbagai dosis ekstrak jahe merah). Tujuan analisis ini yaitu untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak jahe merah pada jumlah folikel ovarium tikus strain wistar dan untuk membandingkan nilai rata-rata yang

diperoleh untuk setiap perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada 2 kelompok yang berbeda yang signifikan.

4) Uji *Post-hoc*

Uji *Post-hoc* bertujuan untuk mengetahui kelompok perlakuan yang memiliki efek penurunan jumlah folikel yang signifikan dari hasil anova. Uji *Post-hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey-HSD* dengan tingkat signifikansi 95% ($p < 0,05$).

5) Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *pearson* bertujuan untuk mengetahui letak perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji *Post-hoc* (*Tukey-HSD*).

6) Uji Regresi *linear*

Uji Regresi *linear* bertujuan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak jahe merah terhadap penurunan jumlah folikel ovarium dan memprediksi besar efek pemberian ekstrak jahe merah setiap dosisnya terhadap penurunan jumlah folikel ovarium melalui persamaan linier yang diperoleh.

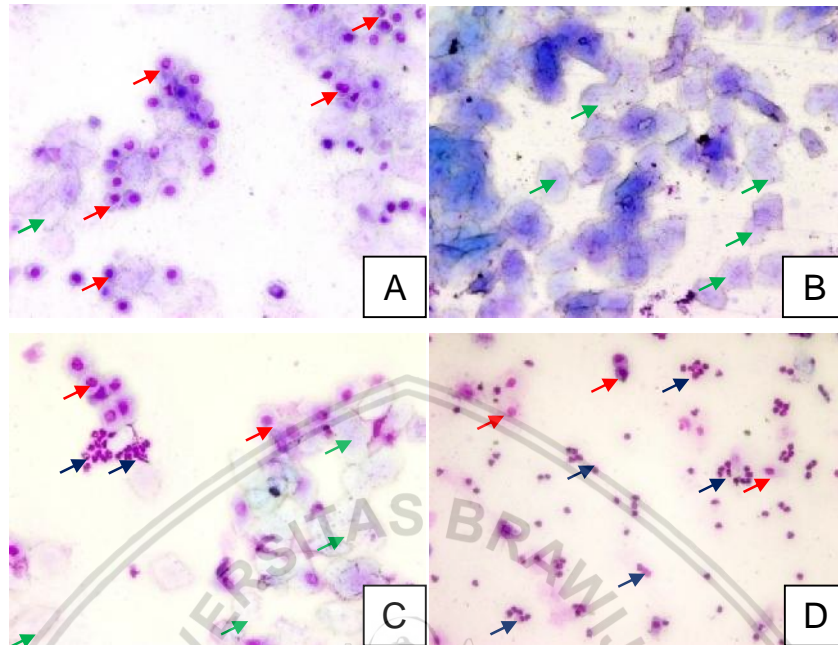
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian *pure experimental* ini menggunakan sampel hewan coba yaitu tikus strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang telah sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Total sampel penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, antara lain kelompok kontrol, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan dengan *aquadest* secara oral melalui sonde lambung; kelompok I, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan berupa ekstrak jahe merah dengan dosis 0,3 gr/kgBB secara oral melalui sonde lambung; kelompok II, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan berupa ekstrak jahe merah dengan dosis 0,6 gr/kgBB secara oral melalui sonde lambung; dan kelompok III, yaitu kelompok yang diberikan perlakuan berupa ekstrak jahe merah dengan dosis 1,2 gr/kgBB secara oral melalui sonde lambung. Hasil penelitian dan analisis data jumlah folikel ovarium dijelaskan sebagai berikut.

5.1 Hasil Pengamatan Mikroskopis Siklus Estrus Tikus Strain Wistar Betina

Untuk menentukan kriteria inklusi tikus dilakukan swab vagina untuk memastikan bahwa siklus estrus tikus normal. Selain itu, juga dilakukan swab vagina pada saat pemberian perlakuan dan terminasi untuk memastikan bahwa tikus berada pada fase estrus awal. Hasil swab vagina tikus dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Siklus Estrus Tikus

Keterangan: Hasil swab vagina tikus strain wistar dengan menggunakan pewarnaan *giemsa* dan pengamatan menggunakan *scan dot slide* dan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x.

- A. Fase Proestrus, tampak hampir seluruh sel epitel berinti
- B. Fase Estrus, tampak sel epitel tidak berinti
- C. Fase Metestrus, tampak adanya dominansi leukosit, beberapa sel tidak berinti dan sedikit sel berinti
- D. Fase Diestrus, tampak adanya dominansi leukosit dan beberapa sel epitel berinti.

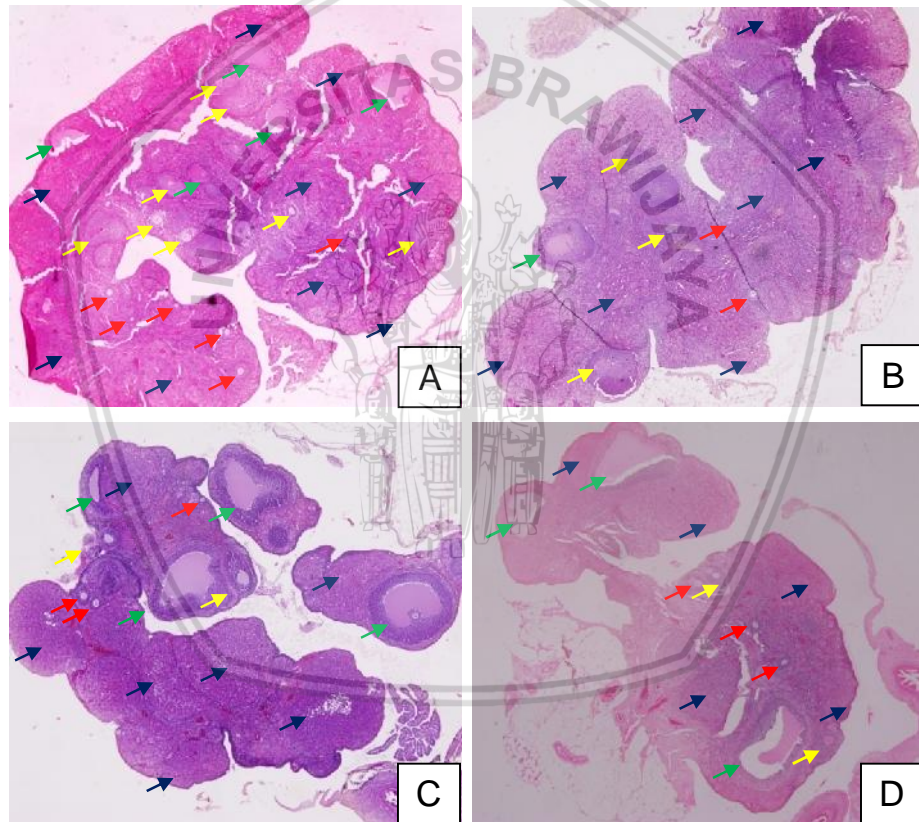
- : Sel epitel berinti
- : Sel epitel tidak berinti
- : Leukosit

Pemberian perlakuan awal dan pembedahan pada tikus dilakukan pada fase estrus yang ditunjukkan oleh gambar B pada gambar 5.1, tepatnya pada fase estrus awal.

5.2 Gambaran Mikroskopis Histologi Ovarium Tikus

Penghitungan jumlah folikel ovarium dilakukan pada sediaan histopatologis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1000x. Folikel yang dihitung adalah folikel primer, folikel sekunder, folikel *de graaf*, dan korpus luteum. Folikel primer dihitung dengan perbesaran 1000x,

folikel sekunder dengan perbesaran 400x, serta folikel *de graaf* dan korpus luteum dengan perbesaran 100x. Pada penelitian ini, masing-masing kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok I, kelompok II, dan kelompok III menunjukkan gambaran mikroskopis histologi ovarium kanan dan kiri yang berbeda-beda. Pada Gambar 5.2 menunjukkan gambaran mikroskopis histologi ovarium kanan, sedangkan pada Gambar 5.3 menunjukkan gambaran mikroskopis histologi ovarium kiri dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*.

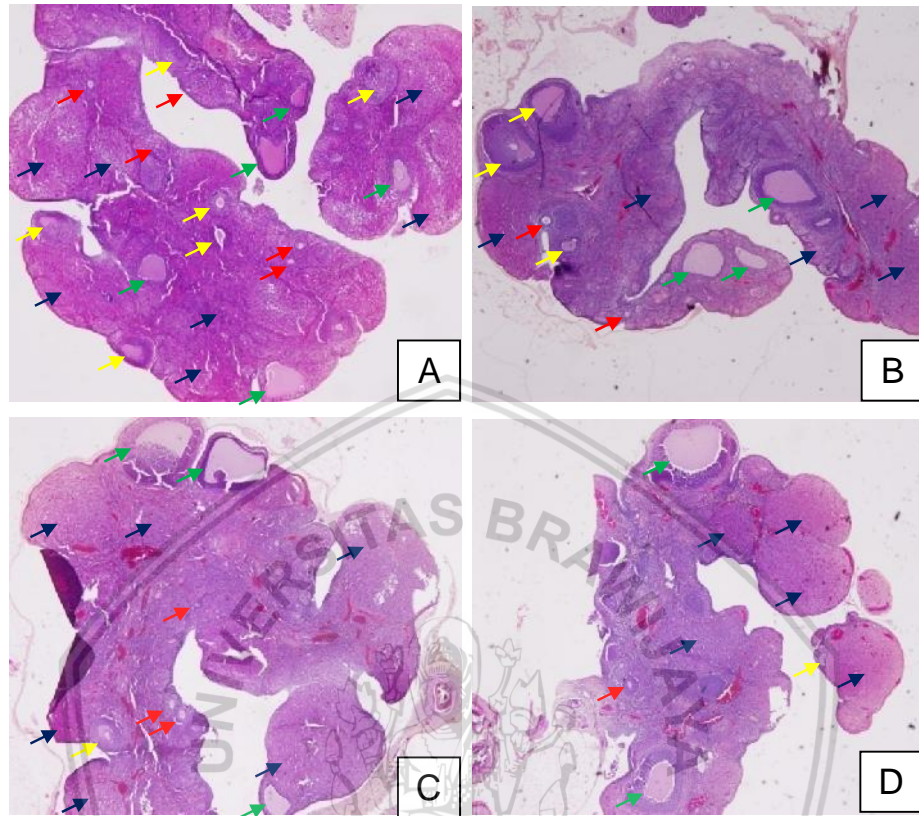


Gambar 5.2 Gambaran Mikroskopis Ovarium Kanan Tikus Strain Wistar

Keterangan: Gambaran mikroskopis ovarium dengan pewarnaan HE dan pengamatan menggunakan *scan dot slide* dan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 40x.

- A. Kontrol : kelompok yang hanya diberikan perlakuan berupa sonde *aquadest*
- B. Kelompok I : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,3 gr/kgBB
- C. Kelompok II : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,6 gr/kgBB
- D. Kelompok III : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 1,2 gr/kgBB

- : Folikel Primer
- : Folikel Sekunder
- : Folikel de Graaf
- : Korpus Luteum



Gambar 5.3 Gambaran Mikroskopis Ovarium Kiri Tikus Strain Wistar

Keterangan: Gambaran mikroskopis ovarium dengan pewarnaan HE dan pengamatan menggunakan *scan dot slide* dan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 40x.

A. Kontrol : kelompok yang hanya diberikan perlakuan berupa sonde *aquadest*

B. Kelompok I : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,3 gr/kgBB

C. Kelompok II : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,6 gr/kgBB

D. Kelompok III : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 1,2 gr/kgBB

→ : Folikel Primer

→ : Folikel Sekunder

→ : Folikel de Graaf

→ : Korpus Luteum

Pada gambaran mikroskopis histologi ovarium tampak berbagai macam folikel mulai dari folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel de graaf, korpus luteum, dan folikel atresia. Pada folikel primer tampak oosit dan sel granulosa yang telah mengalami maturasi dari folikel primordial. Terdapat folikel primer yang terdiri dari selapis sel granulosa (folikel primer *unilaminair*) dan yang terdiri dari 3-5 lapis sel granulosa (folikel primer *multilaminair*). Pada folikel sekunder tampak oosit masih terletak di tengah dengan sel granulosa berlapis

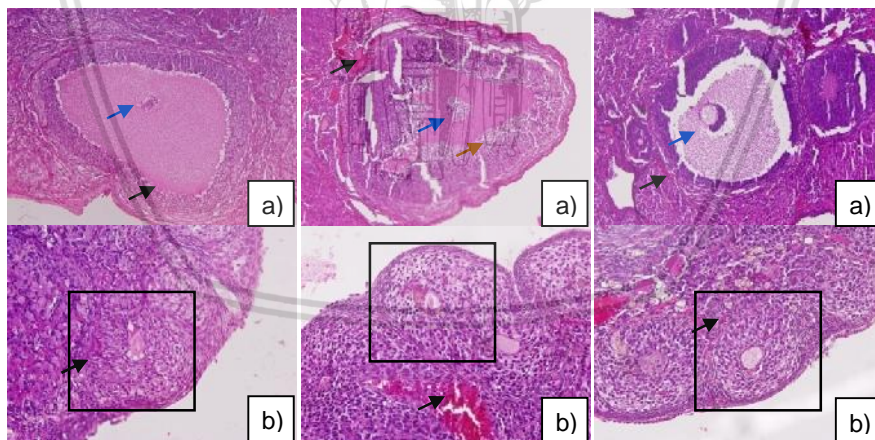
dan sudah terlihat adanya timbunan cairan folikel (*liquor folliculi*) atau disebut juga dengan antrum (folikel antral) namun tidak semua folikel sekunder menampakkan adanya oosit pada sediaan ovarium. Pada folikel *de Graaf* tampak rongga folikel yang membesar sebagai akibat dari timbunan cairan folikel yang banyak dan dinding folikel yang terdiri dari sel granulosa menipis. Tampak juga sel granulosa yang membentuk *cumulus oophorus* dan oosit yang menepi dan melekat pada dinding folikel, tetapi tidak semua folikel *de graaf* menunjukkan wujud seperti ini pada sediaan ovarium.

Pada gambar 5.2 dan gambar 5.3 yang merupakan masing-masing sampel dari setiap kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok 1, kelompok 2, dan kelompok 3, tampak keseluruhan folikel ovarium kanan (gambar 5.2) dan kiri (gambar 5.3) tikus strain wistar. Pada sediaan histopatologis ovarium tersebut, tampak beberapa perbedaan jumlah dan karakteristik folikel ovarium kanan dan kiri pada masing-masing kelompok. Dari segi perbedaan banyaknya folikel ovarium, jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel *de graaf*, dan korpus luteum, tampak lebih sedikit pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan penurunan jumlah folikel ovarium pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang paling tampak adalah pada folikel sekunder dan korpus luteum. Selain itu, tampak lebih banyak folikel atresia pada kelompok perlakuan daripada kelompok kontrol yang terlihat sebagai folikel dengan / tanpa oosit yang memiliki zona pelusida yang menebal / terurai atau sel granulosa yang telah mengalami apoptosis.

Pada perbedaan karakteristik folikel ovarium antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, tampak berbagai perbedaan seperti ukuran folikel dan tebal dinding sel granulosa. Perbedaan yang paling tampak adalah pada karakteristik





folikel *de graaf* dan korpus luteum. Pada kelompok kontrol, ukuran folikel *de graaf* lebih kecil dan memiliki dinding folikel yaitu sel granulosa yang lebih tipis dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Selain itu, beberapa korpus luteum kelompok perlakuan memiliki ukuran lebih besar daripada kelompok kontrol.

Pada kelompok perlakuan, tampak beberapa folikel yang menyerupai folikel *de graaf* yang diduga adalah bentukan *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) dengan karakteristik diameter folikel lebih besar, dinding folikel (sel granulosa) lebih tebal, dan terdapat *cumulus-oocyte complex* (COC) yang terjebak di dalam folikel dengan sel granulosa yang terdispersi pada bagian *cumulus-oophorus*. Selain itu, terdapat bentukan COC yang berada dalam folikel sel lutein (*luteinized follicle*) pada ovarium kelompok perlakuan. Gambaran mikroskopis bentukan folikel yang diduga adalah LUF dan COC adalah sebagai berikut.



Gambar 5.4 Gambaran Mikroskopis *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) dan *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) pada Ovarium Kelompok Perlakuan

Keterangan: Gambar a) adalah gambaran mikroskopis *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) dan b) adalah *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) pada sediaan histopatologis ovarium kelompok perlakuan dengan pengamatan menggunakan *scan dot slide* dan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 100x.

-  : *Trapped COC* (COC yang terjebak di dalam LUF)
-  : COC dalam *luteinized follicle* yang terdapat pada ovarium
-  : Perdarahan (*hemorrhage*)
-  : Proses luteinisasi folikel

Pada gambar 5.4 a) tampak LUF yang diduga akibat dari pemblokiran proses ovulasi. LUF ini merupakan bentuk kegagalan ovulasi sehingga tampak diameter yang lebih besar dan sel granulosa yang tebal sebagai akibat ekspansi yang progresif, dan oosit dalam bentuk COC yang terjebak dalam LUF akibat kegagalan ovulasi melalui sisi apikal ovarium. Selain itu, tampak adanya perdarahan pada antrum dan/atau sekitar sel granulosa sebagai akibat usaha ovulasi yang abnormal melalui sisi basolateral atau proses luteinisasi dari folikel sehingga disebut *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF). Sedangkan pada gambar 5.4 b) tampak adanya oosit dalam bentuk COC pada ovarium yang diduga akibat dari ovulasi yang abnormal yaitu pada sisi basolateral folikel sehingga COC masih berada pada ovarium, antrum dari folikel masuk ke sel interstitial dalam ovarium, dan tampak perdarahan di sekitar folikel yang diduga akibat ovulasi yang abnormal. Selain itu, COC ini berada dalam *luteinized follicle* akibat proses luteinisasi dari adanya kegagalan ovulasi.

5.3 Analisis Data Hasil Penelitian

5.3.1 Analisis Uji Asumsi Normalitas dan Homogenitas

Pengujian data berupa jumlah folikel ovarium tikus strain wistar dilakukan dengan menggunakan *SPSS 20.0 for Windows* dengan tingkat signifikansi sebesar 95% ($p\text{-value} < 0,05$). Analisis data dilakukan dengan uji *One-Way Anova* untuk mengetahui tingkat signifikansi data. Uji asumsi normalitas dan uji asumsi homogenitas dilakukan untuk memenuhi syarat uji parametrik. Uji asumsi normalitas ini dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel < 50 buah sampel. Suatu data dikatakan memenuhi uji normalitas bila $p\text{-value} > 0,05$. Sedangkan uji homogenitas dalam penelitian ini dilakukan dengan

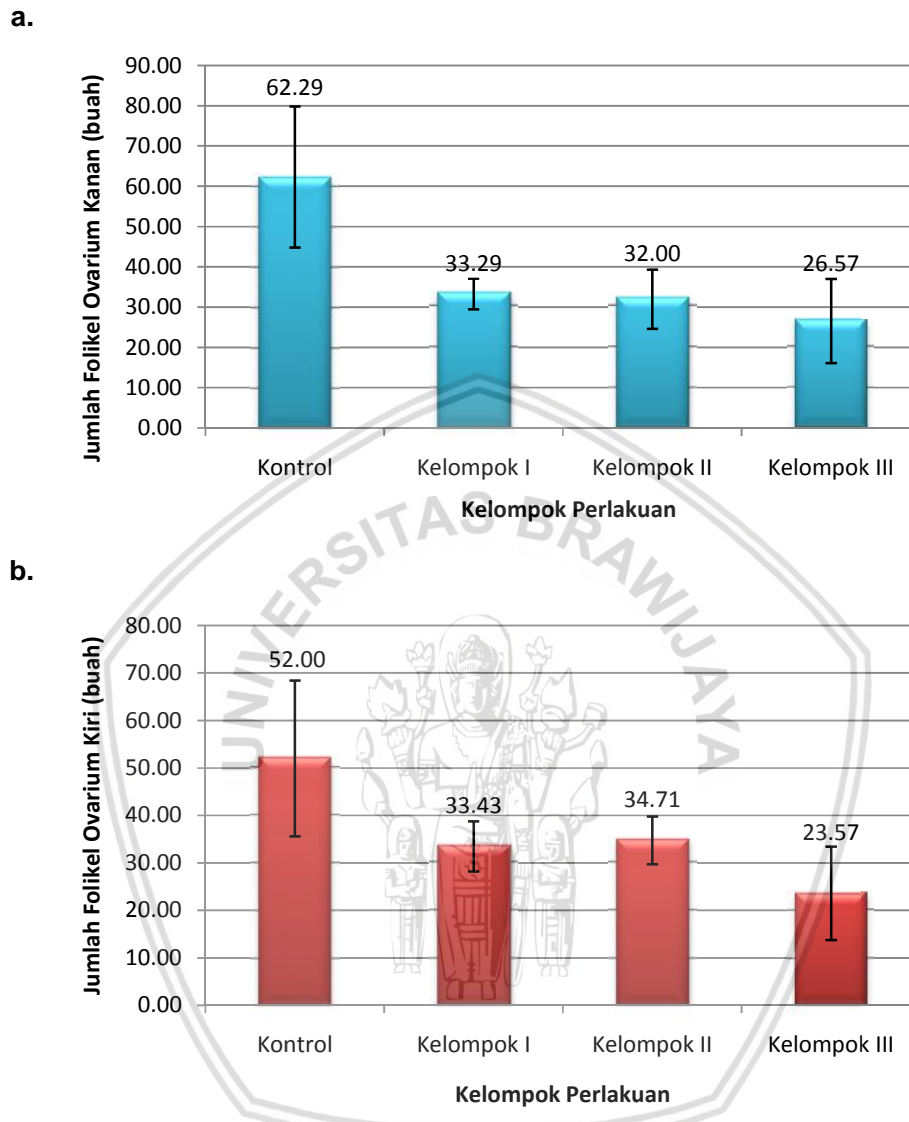
menggunakan uji *Levene*. Uji homogenitas varians dikatakan terpenuhi jika mempunyai *p-value* sebesar > 0.05 . Berdasarkan hasil uji normalitas data, variabel jumlah folikel ovarium kanan mempunyai *p-value* > 0.05 pada kelompok kontrol ($p = 0,08$), kelompok I ($p = 0,477$), kelompok II ($p = 921$), kelompok III ($p = 0.288$) dan berdasarkan hasil uji homogenitas varians, variabel jumlah folikel ovarium kanan memiliki $p = 0,217$ sehingga data jumlah folikel ovarium kanan normal dan homogen. Sedangkan hasil uji normalitas data variabel jumlah folikel ovarium kiri menyatakan bahwa *p-value* $> 0,05$ yaitu pada kelompok kontrol ($p = 0,085$), kelompok I ($p = 0,142$), kelompok II ($0,351$), dan kelompok III ($0,098$) dan hasil uji homogenitas variabel jumlah folikel ovarium kiri mempunyai $p = 0,680$ sehingga data variabel jumlah folikel ovarium kiri adalah normal dan homogen.

5.3.2 Pengaruh Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale var. Rubrum*) Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus Putih Strain Wistar Betina (*Rattus norvegicus*)

Rata-rata jumlah folikel ovarium kanan dan kiri tikus strain wistar pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 5.1 dan gambar 5.5 (a dan b)

Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Folikel Ovarium (buah)

Ekstrak Jahe Merah	N	Jumlah Folikel Ovarium Kanan		Jumlah Folikel Ovarium Kiri	
		Rata-rata (buah)	Std. Deviasi (buah)	Rata-rata (buah)	Std. Deviasi (buah)
Kontrol	7	62,29	17,500	52,00	16,432
Kelompok I (0,3 gr/kgBB)	7	33,29	3,773	33,43	5,287
Kelompok II (0,6 gr/kgBB)	7	32,00	7,348	34,71	5,024
Kelompok III (1,2 gr/kgBB)	7	26,57	10,438	23,57	9,846



Gambar 5.5 Grafik Rata-Rata Jumlah Folikel Ovarium Kanan (a) dan Kiri (b) pada Setiap Kelompok (buah)

Keterangan:

- Kontrol : kelompok yang hanya diberikan perlakuan berupa sonde *aquadest*
- Kelompok I : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,3 gr/kgBB
- Kelompok II : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 0,6 gr/kgBB
- Kelompok III : kelompok yang diberi ekstrak jahe merah dosis 1,2 gr/kgBB

Berdasarkan gambar 5.5 (a), kelompok kontrol memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kanan sebesar 62,29 buah, kelompok I memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kanan sebesar 33,29 buah, kelompok II memiliki jumlah folikel ovarium kanan sebesar 32,00 buah, dan kelompok III memiliki rata-rata jumlah

folikel ovarium kanan sebesar 26,57 buah. Sedangkan pada gambar 5.5 (b), kelompok kontrol memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kiri sebesar 52,00 buah, kelompok I memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kiri sebesar 33,43 buah, kelompok II memiliki jumlah folikel ovarium kiri sebesar 34,71 buah, dan kelompok III memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kiri sebesar 23,57 buah. Dengan demikian, semua kelompok perlakuan memiliki jumlah folikel ovarium lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan kelompok III adalah kelompok yang mempunyai rata-rata jumlah folikel ovarium paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain.

Selanjutnya, untuk menguji tingkat signifikansi data, uji yang dilakukan adalah uji *One-Way* Anova. Hasil uji *One-Way* Anova menyatakan bahwa nilai $p = 0.000$. *P-value* ini memiliki nilai sebesar $< 0,05$ sehingga dari hasil pengujian penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium kanan dan kiri tikus strain wistar. Dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah folikel ovarium tikus strain wistar pada masing-masing perlakuan.

Hasil pengujian *One-Way* Anova menyatakan data jumlah folikel ovarium signifikan sehingga analisis data dapat dilanjutkan dengan pengujian *Post-hoc*. Uji *Post-hoc* yang digunakan adalah *Tukey-HSD*. Hasil uji *post-hoc Tukey-HSD* menyatakan bahwa perbandingan jumlah folikel ovarium kanan antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan mempunyai nilai $p = 0.000$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jahe merah berdampak terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kanan secara signifikan pada dosis 0,3 gr/kgBB, 0,6 gr/kgBB, dan 1,2 gr/kgBB. Pada perbandingan kelompok I dengan kelompok II, terdapat nilai $p = 0,996$ sehingga tidak ada perbedaan yang

signifikan antara pemberian ekstrak jahe dosis 0,3 gr/kgBB dan 0,6 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kanan. Pada perbandingan kelompok I dengan kelompok III, terdapat nilai $p = 0,667$ sehingga tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak jahe merah dosis 0,3 gr/kgBB dan 1,2 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kanan. Sedangkan pada perbandingan kelompok II dengan kelompok III terdapat nilai $p = 0,792$ sehingga tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak jahe merah dosis 0,6 gr/kgBB dan 1,2 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kanan.

Sedangkan pada data jumlah folikel ovarium kiri, hasil uji *post-hoc Tukey-HSD* menyatakan bahwa perbandingan jumlah folikel ovarium kiri antara kelompok kontrol dengan kelompok I mempunyai nilai $p = 0,012$, kelompok kontrol dengan kelompok II mempunyai nilai $p = 0,021$, dan kelompok kontrol dengan kelompok III mempunyai nilai $p = 0,000$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jahe merah berdampak terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kiri secara signifikan pada dosis 0,3 gr/kgBB, 0,6 gr/kgBB, dan 1,2 gr/kgBB. Pada perbandingan kelompok I dengan kelompok II, terdapat nilai $p = 0,995$ sehingga tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak jahe dosis 0,3 gr/kgBB dan 0,6 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kiri dan terjadi sedikit peningkatan jumlah ovarium kiri pada kelompok II jika dibandingkan dengan kelompok I. Pada perbandingan kelompok I dengan kelompok III, terdapat nilai $p = 0,298$ sehingga tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak jahe merah dosis 0,3 gr/kgBB dan 1,2 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kiri. Sedangkan pada perbandingan kelompok II dengan kelompok III terdapat nilai $p = 0,204$ sehingga

tidak ada perbedaan yang signifikan antara pemberian ekstrak jahe merah dosis 0,6 gr/kgBB dan 1,2 gr/kgBB terhadap penurunan jumlah folikel ovarium kiri.

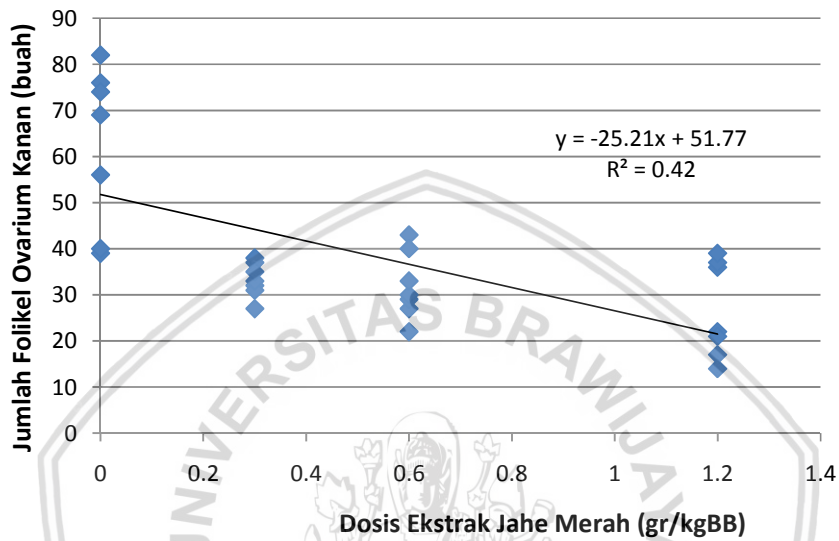
Penentuan kelompok perlakuan yang paling berpengaruh untuk menurunkan jumlah folikel ovarium dapat ditentukan dari rata-rata jumlah folikel ovarium yang paling rendah dan perbandingan tingkat signifikansi dari setiap kelompok. Dari hasil pengujian ini diperoleh bahwa kelompok yang memberikan pengaruh terbaik untuk menurunkan jumlah folikel ovarium kanan dan kiri adalah kelompok III yaitu kelompok yang diberikan ekstrak jahe merah sebesar 1,2 gr/kgBB karena memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium yang secara statistik paling rendah dan memiliki tingkat signifikansi yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain.

Setelah dilakukan *Post-hoc test* menggunakan *Tukey-HSD*, uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan dari uji *Post-hoc*. Hasil uji korelasi menyatakan bahwa jumlah ovarium kanan memiliki nilai $r=-0.702$ dan jumlah folikel ovarium kiri memiliki nilai $r=-0.673$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara ekstrak jahe merah dan jumlah folikel ovarium kanan dan kiri serta mempunyai hubungan yang berbalik arah. Jadi, dari hasil uji korelasi ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak jahe merah mempunyai pengaruh yang kuat terhadap penurunan jumlah folikel ovarium tikus strain wistar.

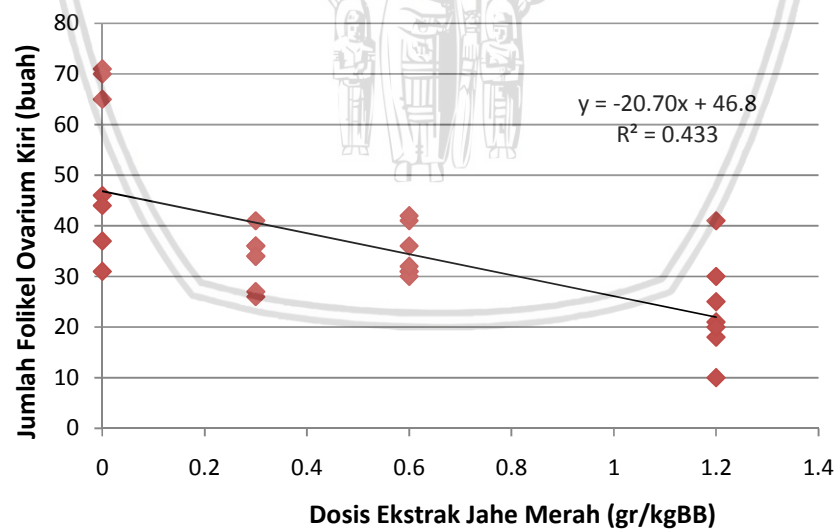
Selanjutnya, dilakukan uji regresi *linear* untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak jahe merah terhadap penurunan jumlah folikel ovarium dan untuk memprediksi besar efek pemberian ekstrak jahe merah setiap

dosisnya terhadap penurunan jumlah folikel ovarium melalui persamaan *linear* yang diperoleh. Hasil uji regresi *linear* dapat dilihat pada gambar 5.6.

a.



b.



Gambar 5.6 Grafik Uji Regresi *Linear* Folikel Ovarium Kanan (a) dan Kiri (b)

Keterangan:

- Pengaruh ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium kanan mempunyai koefisien regresi sebesar -25,21.
- Pengaruh pemberian ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium kiri mempunyai koefisien regresi sebesar -20,70.

Berdasarkan hasil uji regresi pengaruh ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium, persamaan regresinya mempunyai koefisien regresi sebesar -25,21, dan pada jumlah folikel ovarium kiri, persamaan regresinya mempunyai koefisien regresi sebesar -20,70. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak jahe merah sebesar 1 gr/kgBB mampu menurunkan jumlah folikel ovarium kanan sebesar 25,21 buah, dan jumlah folikel ovarium kiri sebesar 20,70 buah. Sedangkan nilai R-square sebesar 42% pada jumlah folikel ovarium kanan dan 43% pada jumlah folikel ovarium kiri menunjukkan bahwa pengaruh yang diberikan oleh ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium adalah sebesar 42% pada ovarium kanan dan 43% pada ovarium kiri. Sisanya yaitu 58% pada jumlah folikel ovarium kanan dan 57% pada jumlah ovarium kiri dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diteliti.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental murni ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jahe merah terhadap jumlah folikel ovarium tikus strain wistar dan mengetahui dosis optimal ekstrak jahe merah dalam pengaruhnya terhadap jumlah folikel ovarium tikus strain wistar. Jumlah folikel ovarium yang dimaksud dalam penelitian ini adalah folikel non atresia, yaitu total dari folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier (*de graaf*), dan korpus luteum. Penelitian telah dilakukan sesuai dengan kriteria inklusi yaitu menggunakan *Rattus norvegicus* galur wistar dengan jenis kelamin betina berumur $\pm 8 - 12$ minggu dengan berat badan $\pm 150 - 200$ gram, sehat, dan mempunyai siklus estrus yang normal selama 2 siklus berturut-turut (4 – 5 hari). Awal pemberian perlakuan dan pembedahan dilakukan pada fase estrus awal.

Berdasarkan uji *One-Way Anova*, hasil penelitian menyatakan bahwa pemberian ekstrak jahe merah pada semua kelompok perlakuan berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan jumlah folikel ovarium baik pada ovarium kanan maupun ovarium kiri tikus ($p = 0,000$). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Dean, *et al* (2016) yang menyatakan terjadinya penurunan folikel total (meliputi folikel primordial, folikel primer, folikel transisional, folikel sekunder, folikel antral) pada ovarium tikus prepubertas yang saat dalam kandungan induknya terpapar indometasin dan asetaminofen yang merupakan antiinflamasi non steroid. Penurunan folikel total ini mempunyai tingkat signifikansi yaitu $p = 0.016$ pada paparan indometasin dan $p < 0.001$ pada paparan asetaminofen.

Adanya penurunan folikel ini juga didukung oleh terjadinya penurunan berat ovarium dengan tingkat signifikansi sebesar $p < 0,001$ (Dean *et al.*, 2016).

Peran COX-2 sangat dibutuhkan untuk proses ovulasi. Tikus yang mengalami manipulasi baik secara genetik maupun secara farmakologi agar kekurangan salah satu dari 2 isoenzim COX, yaitu COX-1 dan COX-2, menunjukkan beberapa abnormalitas reproduksi. Tikus yang mengalami kekurangan COX-1 tidak mengalami gangguan kesuburan, namun memiliki gangguan dalam persalinan dan menurunnya kelangsungan hidup anak. Sedangkan tikus yang mengalami kekurangan COX-2 akan mengarah pada berbagai gangguan reproduksi pada tikus betina, seperti ovulasi dan fertilisasi yang rendah (Hayes *and* Rock, 2002). Adanya ovulasi yang rendah yang merepresentasikan gangguan reproduksi dibuktikan oleh penelitian Akpantah *et al* (2005) yang menyatakan bahwa jumlah oosit yang telah diovulasikan menurun secara signifikan ($p < 0,05$) pada tuba falopi tikus setelah diberikan ekstrak biji *Garcinia Kola* yang mengandung antiinflamasi. Selain itu, penelitian oleh Gaytán *et al* (2006) juga menyatakan terjadinya penurunan ovulasi pada tikus yang dipapar inhibitor COX-2. Lalu, penurunan ovulasi karena adanya antiinflamasi ini tidak hanya terjadi pada tikus. Penelitian oleh Yokota *et al* (2015) menyatakan bahwa terjadi penurunan *ovulation rate* yang signifikan ($p = 0.015$) pada ikan yang dipapar oleh *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID).

Pada hasil uji *Post-Hoc* jumlah folikel ovarium kanan, perbandingan antara kelompok kontrol dengan seluruh kelompok perlakuan yaitu kelompok yang diberikan ekstrak jahe merah dengan dosis 0,3 gr/kgBB, 0,6 gr/kgBB, dan 1,2 gr/kgBB, mempunyai nilai $p = 0.000$ sehingga pemberian 3 tingkat dosis tersebut signifikan menurunkan jumlah folikel ovarium dengan prinsip

antiinflamasi. Sedangkan pada hasil uji *Post-Hoc* jumlah folikel ovarium kiri, perbandingan antara kelompok kontrol dan setiap kelompok perlakuan, yaitu kelompok I, II, dan III, masing-masing mempunyai nilai $p = 0,012$; $0,021$; dan $0,000$ sehingga pemberian 3 dosis ini juga signifikan menurunkan jumlah folikel ovarium kiri. Hasil keseluruhan uji *Post-Hoc* tersebut menyatakan bahwa terdapat pengaruh antiinflamasi yang signifikan pada jahe merah terhadap penurunan jumlah folikel ovarium mulai dari dosis $0,3$ gr/kgBB sampai dengan $1,2$ gr/kgBB. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Lestari (2002) yang melakukan uji antiinflamasi ekstrak jahe yang menyatakan bahwa ekstrak jahe yang diberikan secara oral pada tikus telah memberikan efek antiinflamasi yang signifikan pada dosis $0,9$ gr/kgBB. Dosis ekstrak jahe tersebut memiliki efek antiinflamasi yang signifikan yaitu dengan nilai $p = 0,000$, memiliki onset antiinflamasi pada 30 menit pertama, optimal pada 60 menit pertama, namun sedikit menurun pada 120 menit pertama (Lestari, 2002). Diduga kandungan gingerol yang melimpah pada rimpang jahe sangat efektif untuk menghambat biosintesis prostaglandin sebagai mediator inflamasi melalui aktivitas COX (van Breemen *et al.*, 2011).

Perbandingan tingkat signifikansi setiap kelompok pada uji *Post Hoc* dan rata-rata dari setiap kelompok dapat menentukan dosis optimal ekstrak jahe merah dalam menimbulkan infertilitas dengan menurunkan jumlah folikel ovarium tikus strain wistar. Pada prinsip toksisitas, dosis optimal ini ditentukan oleh penurunan jumlah ovarium yang telah signifikan pada dosis yang paling minimal. Jika dianalisis pada jumlah folikel ovarium kanan tikus, maka diduga dosis ekstrak jahe merah yang optimal adalah dosis $0,3$ gr/kgBB yaitu pada kelompok I karena mempunyai nilai $p = 0,000$ jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan dosis $0,3$ gr/kgBB adalah dosis yang paling rendah dalam penelitian ini.

Pada jumlah folikel ovarium kiri tikus, diduga dosis ekstrak jahe merah yang optimal juga terdapat pada dosis 0,3 gr/kgBB yaitu pada kelompok I karena mempunyai nilai $p = 0,012$ jika dibandingkan dengan kelompok kontrol sehingga telah signifikan pada dosis yang paling rendah. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak jahe merah yang optimal dalam menurunkan jumlah folikel ovarium kanan dan kiri tikus adalah 0,3 gr/kgBB. Namun, peningkatan dosis ekstrak jahe merah pada penelitian ini juga menimbulkan penurunan rata-rata dan tingkat signifikansi jumlah folikel yang lebih besar yaitu pada dosis 0,6 gr/kgBB dan pada dosis 1,2 gr/kgBB. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Gaytán *et al* (2002) bahwa ovulasi dapat diblokir secara eksperimental oleh obat antiinflamasi dosis tinggi yang diberikan sebelum lonjakan LH karena begitu LH mulai meningkat, ovulasi tersebut mungkin tidak dapat diturunkan oleh obat apapun.

Salah satu gen yang diinduksi LH pada folikel preovulatori adalah gen yang mengkode enzim COX-2 (Sirois *et al.*, 2004). LH bekerja melalui gen *amphiregulin* (AREG) dan *epiregulin* (EREG) yang mengaktifasi COX-2, dengan demikian dapat meningkatkan biosintesis dari PGE_2 (Yerushalmi *et al.*, 2016) melalui metabolisme asam arakidonat (Baratawijaya dan Rengganis, 2010). PGE_2 ini bekerja melalui pasangan reseptor protein G yaitu EP_2 dan EP_4 untuk berbalik arah menginduksi AREG dan EREG yang mengaktifasi mediator *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2). Aktivasi ERK1/2 ini dibutuhkan untuk menginduksi dan mengaktifasi gen esensial untuk maturasi oosit, ovulasi, dan luteinisasi (Yerushalmi *et al.*, 2016). Jadi, penurunan COX-2 dan PGE_2 dapat mengurangi aktivasi ERK1/2 yang dapat menginduksi gen esensial yang dibutuhkan untuk maturasi folikel dan ovulasi. Hal ini sesuai

dengan penelitian Dean, *et al* (2016) yang menyatakan bahwa terjadinya penurunan maturasi folikel pada tikus prepubertas akibat paparan indometasin dan asetaminofen selama tikus dalam kandungan induknya dengan dibuktikan adanya penurunan pada folikel primordial, folikel transisional, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel antral. Selain itu, penelitian dari Sumpownon, *et al* (2015) membuktikan adanya peningkatan PGE₂ saat terjadinya proliferasi dari oosit dan maturasi folikel ovarium pada ikan.

Pada hasil uji korelasi *Pearson* menyatakan bahwa ada hubungan yang kuat antara ekstrak jahe merah dan jumlah ovarium kanan dan kiri tikus serta mempunyai hubungan yang negatif atau berbalik arah. Artinya, pemberian ekstrak jahe merah memberikan pengaruh penurunan pada jumlah folikel ovarium kanan dan kiri tikus. Hal ini tidak hanya dibuktikan oleh penelitian Dean *et al* (2016) yang melakukan pemaparan antiinflamasi non steroid pada tikus saja, namun juga penelitian pada ulat sutra yaitu oleh Machado *et al* (2007) yang menyatakan bahwa terjadi penurunan perkembangan folikel setelah dilakukan paparan terhadap antiinflamasi non steroid yaitu indometasin dan aspirin.

Hasil uji regresi *linear* menyatakan bahwa peningkatan dosis ekstrak jahe merah sebesar 1 gr/kgBB mampu menurunkan jumlah folikel ovarium kanan sebesar 25,21 buah dan jumlah folikel ovarium kiri sebesar 20,70 buah. Pemberian ekstrak jahe merah memberikan pengaruh sebesar 42% pada penurunan jumlah folikel ovarium kanan dan 43% pada penurunan jumlah folikel ovarium kiri. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Dean *et al* (2016) yang menyatakan bahwa antiinflamasi non steroid yaitu indometasin dan asetaminofen memberikan pengaruh sebesar 40% pada terjadinya penurunan folikel total (meliputi foikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel antral) pada

ovarium tikus prepubertas yang induknya terpapar saat hamil. Selain itu, antiinflamasi non steroid ini juga memberikan pengaruh terhadap penurunan folikel primordial sebesar 60%, namun terjadi sedikit peningkatan pada folikel antral sebesar 25 – 34% (Dean *et al.*, 2016).

Selain tampak jumlah folikel yang lebih sedikit pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol, tampak juga karakteristik folikel yang berbeda pada kelompok perlakuan. Diduga beberapa folikel *de graaf* yang tampak memiliki diameter yang lebih besar merupakan bentuk *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF). LUF ini diduga terbentuk karena adanya paparan antiinflamasi pada ekstrak jahe merah yaitu *gingerol* dan *shogaol* yang merupakan inhibitor enzim COX-1 dan COX-2 yang dapat mengakibatkan kejadian infertilitas sekunder (Bone and Mills, 2013; Micu *et al.*, 2011). *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) yang juga disebut sebagai *Hemorrhagic Anovulatory Follicle* (HAF) terjadi ketika folikel preovulatori gagal mengalami ovulasi yang kemudian terjadi perdarahan pada antrum (Bashir *et al.*, 2016). Studi yang dilakukan terhadap perempuan yang sehat yang dipapar NSAID menunjukkan adanya ruptur folikel yang tertunda namun tidak ada modifikasi pada siklus hormonalnya, walaupun beberapa studi menyatakan adanya penurunan hormon progesteron (Micu *et al.*, 2011). Penurunan hormon progesteron ini disebabkan oleh LUF yang tidak mampu mensekresi progesteron sebanyak yang dihasilkan oleh korpus luteum yang berkembang dari folikel yang telah mengalami ovulasi normal (Cuervo-Arango *et al.*, 2011). Pada penelitian oleh Cuervo-Arango *et al* (2011) mengenai pemberian inhibitor prostaglandin pada kuda menunjukkan kelompok kontrol mengalami ovulasi pada 36 – 48 jam pertama sedangkan kelompok perlakuan yang diberikan perlakuan berupa pemberian *flunixin meglumine* yang merupakan

inhibitor prostaglandin mengalami perkembangan LUF dengan bertambahnya diameter folikel pada 36 – 48 jam pertama setelah pemberian hCG. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, folikel yang menyerupai folikel *de graaf* dengan diameter yang lebih besar diduga adalah *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF).

Tidak hanya diameter yang lebih besar yang menunjukkan karakteristik dari LUF ini. Adanya dinding folikel yang tebal dan terdapat proses luteinisasi pada folikel juga merupakan karakteristik dari LUF ini (Bashir *et al.*, 2016). Beberapa LUF dengan *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) yang terjebak di dalamnya menunjukkan ruptur dinding folikel pada sisi basolateral dengan pengeluaran cairan folikel dan sel granulosa di interstitial ovarium. Hal ini dapat mengarah pada pecahnya pembuluh darah dan limfe, serta adanya perdarahan dan emboli cairan folikel dan sel granulosa. Hal ini juga mengindikasikan induksi dari ovulasi yang abnormal yaitu melalui sisi basolateral ovarium bukan pada sisi apikalnya (Gaytán *et al.*, 2006). Lalu, *cumulus oophorus* akan terdispersi, sedangkan oosit berada pada metafase II (Gaytán *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini, tidak semua COC terjebak di dalam LUF. Beberapa COC tampak dikelilingi sel lutein pada ovarium dan tampak perdarahan di sekelilingnya. Hal ini diduga akibat dari proses ovulasi yang abnormal, seperti pada penelitian Gaytán *et al* (2003), bahwa 50% tikus yang dipapar indometasin mengalami ruptur folikel pada sisi basolateral, dan ditemukan oosit (COC) pada bagian interstitial ovarium yang berisi darah dan cairan folikel, sedangkan 39% oosit ditemukan di tuba falopi, dan 11% oosit tetap terjebak pada LUF. Penelitian lain yang juga dilakukan oleh Gaytán *et al* (2002) menyatakan bahwa pada pukul 09.00 fase estrus ditemukan COC yaitu 35% ada pada bagian interstitial ovarium melalui ovulasi pada sisi basolateral, 16% ada pada tuba falopi dengan ovulasi

yang normal, dan 44% tetap terjebak dalam LUF pada tikus yang dipapar indometasin. Menurut Bone and Mills (2013), gingerol lebih berpengaruh untuk menghambat biosintesis prostaglandin secara *in vitro* daripada indometasin sehingga diduga *gingerol* berpengaruh terhadap pembentukan LUF dan ovulasi COC yang abnormal akibat pemblokiran proses ovulasi melalui inhibisi enzim COX-1 dan COX-2.

Pemberian ekstrak jahe merah pada tikus strain wistar dengan dosis 0,3 gr/kgBB sudah memberikan efek penurunan jumlah folikel yang signifikan terhadap kelompok kontrol. Pada variabel ekstrak jahe merah, pemberian dosis ekstrak jahe merah yang kurang bervariasi merupakan keterbatasan dari penelitian ini. Sedangkan pada variabel jumlah folikel ovarium, jumlah folikel yang diteliti adalah jumlah seluruh folikel non atresia atau folikel yang mengalami maturasi sehingga tidak spesifik pada satu atau dua jenis folikel dan tidak menganalisis secara spesifik jumlah folikel baru akibat paparan antiinflamasi seperti *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) atau adanya bentukan seperti *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) pada ovarium. Penelitian ini juga tidak menganalisis tentang diameter berbagai jenis folikel sehingga tidak adanya hasil mengenai perbedaan karakteristik masing-masing jenis folikel yang dipapar oleh ekstrak jahe merah. Lalu, tidak adanya analisis mengenai onset dan durasi dari efek antiinflamasi ekstrak jahe merah dalam menimbulkan penurunan jumlah folikel ovarium juga menjadi keterbatasan dalam penelitian ini. Penelitian ini juga terdapat variasi waktu dikarenakan metode pemberian ekstrak jahe merah menggunakan batasan siklus estrus, dan dalam penelitian ini tidak menganalisis waktu jumlah folikel dapat normal kembali setelah penghentian pemberian ekstrak jahe merah.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) terhadap jumlah folikel ovarium tikus putih strain wistar betina (*Rattus norvegicus*) dapat disimpulkan bahwa ekstrak jahe merah dapat berpengaruh terhadap penurunan jumlah folikel ovarium tikus strain wistar, yaitu memiliki rata-rata jumlah folikel ovarium kanan pada kelompok kontrol sebesar 62,29 buah; kelompok I sebesar 33,29 buah; kelompok II sebesar 32 buah; dan kelompok III sebesar 26,57 buah; serta rata-rata jumlah folikel ovarium kiri pada kelompok kontrol sebesar 52 buah, kelompok I sebesar 33,43 buah, kelompok II sebesar 34,71 buah, dan kelompok III sebesar 23,57 buah. Ekstrak jahe merah ini berpengaruh secara signifikan mulai dari dosis 0,3 gr/kgBB sehingga dosis tersebut adalah dosis optimal ekstrak jahe merah dalam menurunkan jumlah folikel ovarium tikus strain wistar.

7.2 Saran

1. Diperlukan adanya penelitian lebih lanjut mengenai variasi dosis ekstrak jahe merah yang lebih lebar untuk mencapai dosis optimal dan efektif dalam menurunkan jumlah folikel ovarium.
2. Diperlukan adanya penelitian yang menganalisis mengenai onset dan durasi efek antiinflamasi ekstrak jahe merah yang menimbulkan penurunan jumlah folikel ovarium.

3. Diperlukan penelitian dengan variabel jenis folikel ovarium yang lebih spesifik dan melihat jumlah serta diameter masing-masing jenis folikel untuk menentukan perbedaan karakteristik dari masing-masing jenis folikel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berbagai dosis.
4. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai bentukan folikel baru akibat paparan antiinflamasi seperti *Luteinized Unruptured Follicle* (LUF) dan *Cumulus-Oocyte Complexes* (COC) pada ovarium.
5. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan metode pemberian perlakuan menggunakan batasan hari agar tidak terjadi variasi waktu dan juga melihat waktu jumlah folikel dapat normal kembali ketika pemberian dihentikan untuk melihat keefektifitasan jika digunakan sebagai alat kontrasepsi.
6. Diperlukan adanya penelitian mengenai efek kontraseptif jahe merah sehingga dapat diaplikasikan menjadi alat kontrasepsi yang efektif dan aman untuk para wanita usia subur.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad S.A., 2008. *Ilmu Kimia dan Kegunaan: Tumbuh-Tumbuhan Obat Indonesia*, Institut Teknologi Bandung, Bandung. p. 329.
- Akpantah A.O., Oremosu A.A., Noronha C.C., Ekanem T.B., and Okanlawon A.O. Effect of *Garcinia Kola Seed Extract* on Ovulation, Oestrus Cycle and Foetal Development in Cyclic Female Sprague-Dawley Rats, *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 2005, 20 (1-2): 58-62.
- Asmadi, 2008. *Konsep Dasar Keperawatan*, EGC, Jakarta, p.156.
- Atta-ur-Rahman, 2012. *Studies in Natural Product Chemistry*, Elsevier, London. p. 303.
- Balasubramanian P., Jagannathan L., Subramanian M., Gilbreath E.T., MohanKumar P.S., and MohanKumar S.M.J. High Fat Diet Affects Reproductive Function in Female Diet-Induced Obese and Dietary Resistant Rats. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24 (5): 748-755.
- Baratawijaya K.G. dan Rengganis I., 2010. *Imunologi Dasar*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, p. 259-260, 265-268.
- Bashir S.T., Gastal M.O., Tazawa S.P., Tarso S.G.S., Hales D.B., Cuervo-Arango J., *et al.* The Mare as A Model for Luteinized Unruptured Follicle Syndrome: Intrafollicular Endocrine Milieu. *Reproduction*, 2016, 151: 271-283.
- B dis J., Papp S., Vermes I., Sulyok E., Tamás P., Farkas B., *et al.* Platelet-Associated Regulatory System (PARS) with Particular Reference to Female Reproduction. *Journal of Ovarian Research*, 2014, 7 (55): 1-10.
- Bogdanske J.J., Stelle S.H., Riley M.R., and Schiffman B.M, 2010. *Laboratory Rat Procedural Techniques Manual and DVD*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, p. 67-69.
- Bone K., and Mills S., 2013. *Principles and Practice of Phytotherapy*, 2nd Ed., Churchill Livingstone Elsevier, London. p. 581.
- Brooks P., Emery P., Evans J.F., Fenner H., Hawkey C.J., Patrono C., *et al.* Interpreting The Clinical Significance of The Differential Inhibition of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2. *Rheumatology*, 1999, 38(8): 779-788.
- Campbell N.A., Reece J.B., and Mitchell L.G., 1974. *Biology*, 5th Ed., Wamen Manalu (penerjemah), 2004, Erlangga, Jakarta, Indonesia, hal. 162.
- Campos K.E., Volpato G.T., Calderon I.M.P., Rudge M.V.C., and Damasceno D.C. Effect of Obesity on Rat Reproduction and on The Development of Their Adult Offspring. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2008, 41: 122-125.
- Croy B.A., Yamada A.T., DeMayo F.J., and Adamson S.L., 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Elsevier, London. p. 85-88.
- Cuervo-Arango J., Beg M.A., and Ginther O.J. Follicle and Systemic Hormone Interrelationships during Induction of Luteinized Unruptured Follicles with A Prostaglandin Inhibitor in Mares. *Theriogenology*, 2011, 76: 361-373.

- Dean A., Driesche S.V.D., Wang Y., McKinnel C., Macpherson S., Eddie S.L., et al. Analgesic Exposure in Pregnant Rats Affects Fetal Germ Cell Development with Inter-Generational Reproductive Consequences. *Scientific Report*, 2016, 6(19789): 1-12.
- Duke J.A., Bogenschutz-Godwin M.J., and duCellier J., 2003. *CRC Handbook of Medicinal Spices*, CRC Press, Florida. p. 33-35.
- Gaytán E., Tarradas E., Morales C., Bellido C., and Sánchez-Criado J. Morphological Evidence for Uncontrolled Proteolytic Activity During The Ovulatory Process in Indomethacin Treated Rats. *Reprod*, 2002, 123: 639-649.
- Gaytán F., Bellido C., Gaytán M., Morales C., and Sánchez-Criado J.E. Differential Effects of RU486 and Indomethacin on Follicle Rupture during the Ovulatory Process in The Rat. *Biology of Reproduction*, 2003, 69: 99-105.
- Gaytán M., Bellido C., Morales C., Sánchez-Criado J.E., and Gaytán F. Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. *Reproduction*, 2006, 132: 571-577.
- Hanana A., 2013. *262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Penebar Swadaya, Jakarta, p. 129.
- Harlis W.O., 2014. *Penuntun Praktikum Fisiologi Reproduksi Hewan*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo, Kendari.
- Hayes E.C. and Rock, J.A. COX-2 Inhibitors and Their Role in Gynecology. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2002, 57 (11): 768-780.
- Hermawan R., Sitorus T.D., Sastramihardja H.S. Efek Pemberian Niasin terhadap Glukosa Darah pada Tikus Wistar dengan Obesitas. *Majalah Kedokteran Bandung*, 43(1): 16-18.
- Hidayati F., Agusmawanti P., Firdausy M.D. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) terhadap Jumlah Sel Makrofag Ulkus Traumatikus Mukosa Mulut Akibat Bahan Kimiawi. *Odonto Dental Journal*, 2015, 2 (1): 51-57.
- Higuchi Y., Yoshimura T., Tanaka N., Ogino H., Sumiyama M., and Kawakami S. Different Time-Course Production of Peptidic and Nonpeptidic Leukotrienes and Prostaglandins E₂ and F₂ in The Ovary during Ovulation in Gonadotropin-Primed Immature Rats. *Prostaglandins*. 49: 131-140.
- Hu J., Guo Z., Glasius M., Kristensen K., Xiao L., and Xu X. Pressurized Liquid Extraction of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with Bioethanol: An Efficient and Sustainable Approach. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 5765-5773.
- Knight O.M. 2014. *Characterizing the Role of Eicosanoids in Maturation-Inducing Steroids-Mediated Ovulation and Spawning in the Zebrafish (Danio rerio)*. Thesis. Tidak diterbitkan, Integrative Biology University of Guelph, Ontario.
- Kurjak A. and Arenas J.B., 2005. *Donald School Textbook of Transvaginal Sonography*, 3rd Ed., p. 374.

- Lestari R. 2002. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe (Zingiber officinale) sebagai Analgesik dan Antiinflamasi pada Tikus*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Leung P.C.K. and Adashi E.Y., 2004. *The Ovary*, 2nd Ed., Elsevier Academic Press, San Diego, p. 239.
- Lowe J.S. and Anderson P.G., 2015. *Stevens & Lowe's Human Histology*, 4th Ed., Elsevier Mosby, p. 349-353.
- Lukito A.M., 2007. *Petunjuk Praktis Bertanam Jahe*, Agromedia, Jakarta, p. 1, 3.
- Machado E., Swevers L., Sdralia N., Medeiros M.N., Mello F.G., and Iatrou K. Prostaglandin Signaling and Ovarian Follicle Development in The Silkmoth, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37: 876-885.
- Magowan B.A., Owen P., and Thomson A., 2014. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 3rd Ed., Elsevier, China, p. 72.
- Marcondes F.K., Bianchi F.J., and Tanno A.P. Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. *Braz J Biol*, 2002, 62 (4A): 609-614.
- Martinez-Boví R. and Cuervo-Arango J. Intrafollicular Treatment with Prostaglandins PGE₂ And PGF₂ Inhibits The Formation of Luteinised Unruptured Follicles and Restores Normal Ovulation in Mares Treated with Funixin-Meglumine. *Equine Veterinary Journal*, 2014, 48 (2): 211-217.
- Manuaba I.B.G., 2007. *Pengantar Kuliah Obstetri*, EGC, Jakarta, p. 82-84.
- Marks D.B., Marks, A.D., Smith, C.M., 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*, EGC, Jakarta, p. 60.
- Marks F. and Fürstenberger G., 1999. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Other Eicosanoids: From Biogenesis to Clinical Application*, Wiley-VCH, Toronto, p. 199-203.
- Micu M.C., Micu R., and Ostensen M. Luteinized Unruptured Follicle Syndrome Increased by Inactive Disease and Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitors in Women With Inflammatory Arthropathies. *Arthritis Care & Research*, 2011, 63 (9): 1334-1338.
- Murdoch W.J. Accumulation of Thromboxane B2 within Periovulatory Ovine Follicles: Relationship to Adhesion of Platelets to Endothelium. *Prostaglandins*, 1986, 32 (4): 597-604.
- Purwanto B., 2013. *Herbal dan Keperawatan Komplementer*, Nuha Medika, Yogyakarta, p. 200-205.
- Redaksi Agromedia, 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat: 431 Jenis Tanaman Pengempur Aneka Penyakit*, Agromedia Pustaka, Jakarta Selatan, p. 86.
- Rukmana R., 2004. *Temu-Temuan*, Kanisius, Yogyakarta, p. 31.
- Sari K.I.P., Periadnadi, dan Nasir N., Uji Antimikroba Ekstrak Segar Jahe-Jahean (*Zingiberaceae*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 2013, 2 (1): 20-24.

- Sirois J., Sayasith K., Brown K.A., Stock A., Bouchard N., and Dore M. Cyclooxygenase-2 and Its Role In Ovulation: A 2004 Account. *Human Reproduction Update*, 2004, 10: 373–385.
- Soeharto I., 2004. *Penyakit Jantung Koroner dan Serangan Jantung*, 2th Ed., PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, p. 279.
- Solimun, 2002. *Multivariate Analysis Structural Equation Modeling*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Strauss J.F., Barbieri R.L., and Yen S.S.C., 2014. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*, 7th Ed., Elsevier, China, p. 28.
- Stright B.R., 2001. *Panduan Belajar: Keperawatan Ibu-Bayi Baru Lahir*, 3rd Ed., Wijayarini M.A. (penerjemah), 2005, EGC, Jakarta, Indonesia, p. 59-60.
- Suckow M.A., Weisbroth S.H., and Franklin C.L., 2006. *The Laboratory Rat*. Elsevier Academic Press, Burlington, p. 3, 72, 149-150.
- Sumpownon C., Engsusophon A., Siangcham T., Sugiyama E., Soonklang N., Meeratana P., et al. Variation of Prostaglandin E Concentrations in Ovaries and Its Effects On Ovarian Maturation and Oocyte Proliferation in The Giant Fresh Water Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 223: 129-138.
- Suprpti M.L., 2003. *Aneka Awetan Jahe*, Kanisius, Yogyakarta, p. 13.
- Syafrudin dan Hamidah, 2009. *Kebidanan Komunitas*, EGC, Jakarta, p. 41-43.
- Tim Lentera, 2004. *Khasiat dan Manfaat Jahe Merah Si Rimpang Ajaib*, Agromedia Pustaka, Jakarta, p. 9, 11-13.
- Umami R. 2014. *Pengaruh Vitamin C dan Vitamin E terhadap Jumlah Sel Epitel Sekretorik dan Tebal Sel Otot Polos Tuba Falopii pada Tikus Betina yang Dipapar Monosodium Glutamat*. Thesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- van Breemen R.B., Tao Y., Li W. Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Ginger (*Zingiber officinale*). *Fitoterapia*, 2011, 82: 38-43.
- Wasito, 2011. *Obat Tradisional Kekayaan Indonesia*, 1st Ed., Graha Ilmu, Yogyakarta, p. 70-72.
- Watson R.R. and Preedy V.R., 2013. *Bioactive Food as Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, Elsevier, San Diego. p. 14.
- Wibowo A.S., 2005. *45 Kisah Bisnis Top Pilihan*, Elex Media Komputindo, Jakarta. p. 153.
- Yerushalmi G.M., Markman S., Yung Y., Maman E., Aviel-Ronen S., Orvieto R., et al. The Prostaglandin Transporter (PGT) as A Potential Mediator of Ovulation. *Fertility*, 2016, 8 (338): 1-11.
- Yokota H., Eguchi S., Hasegawa S., Okada K., Yamamoto F., Sunagawa A., et al. Assessment of In Vitro Antioviulatory Activities of Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs and Comparison with In Vivo Reproductive Toxicities of Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology*, 2015, 31: 1710-1719.