



**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP  
LAMA SIKLUS ESTRUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR  
BETINA YANG DIBERI RHODAMIN B**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

**Maulida Diah Setiawati**

**NIM. 15507060011006**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEBIDANAN**

**JURUSAN KEBIDANAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**



**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP  
LAMA SIKLUS ESTRUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR  
BETINA YANG DIBERI RHODAMIN B**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



Oleh:

**Maulida Diah Setiawati**

**NIM. 15507060011006**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEBIDANAN**

**JURUSAN KEBIDANAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**



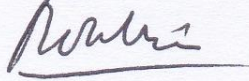
## HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR  
PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP LAMA  
SIKLUS ESTRUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR BETINA  
YANG DIBERI RHODAMIN B

Oleh:  
**Maulida Diah Setiawati**  
155070600111006

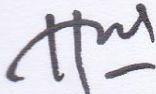
Telah diuji pada  
Hari : Selasa  
Tanggal : 21 Mei 2019  
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I



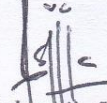
Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H., M.Sc., Sp.Par.K.  
NIP. 195204101980021001

Pembimbing-I/Penguji-II,



Dr. Husnul Khotimah, S.St., M.Kes  
NIP. 197511252008013001

Pembimbing-II/ Penguji-III



Lilik Indahwati, SST., M.Keb.  
NIK. 201618303232001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sarjana Kebidanan



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







## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maulida Diah Setiawati

NIM : 155070600111006

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 pengambil-alihan 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, 27 Mei 2019

Yang membuat pernyataan,

(Maulida Diah Setiawati)

NIM. 155070600111006



## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal dengan judul “Pengaruh Pemberian Vitamin C dan Vitamin E terhadap Lama Siklus Estrus Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Betina yang Diberi Rhodamin B”

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari fakta bahwa menstruasi merupakan salah satu indikator kesuburan seorang wanita. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa vitamin C dan vitamin E mampu menjadi antioksidan untuk mengatasi masalah gangguan hormon akibat rhodamin B yang dapat menyebabkan gangguan kesuburan.

Dengan selesainya proposal ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bantuan, yang dengan sabar membimbing untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Lilik Indahwati, SST, M.Keb. sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
3. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H., M.Sc. Sp.Par.K. sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir ini,
4. Linda Ratnawati, SST, M.Kes. sebagai Ketua Program Studi Sarjana Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di PS Sarjana Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya





5. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA (K), sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar
7. Yang tercinta Kedua orangtua, ayah Mashudi dan Ibu Siti Jariyah, serta adik M. Rizky Ariadi atas segala pengertian, dan kasih sayangnya
8. Teman-temanku Rizky Kurniasari, Mukhlisa, dan Elsa, atas konsultasi, saran, dan masukannya.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 13 Mei 2019

Penulis



## ABSTRAK

Setiawati, Maulida Diah. 2019. *Pengaruh Pemberian Vitamin C dan Vitamin E terhadap Siklus Estrus Tikus (Rattus norvegicus) yang Diberi Rhodamin B*. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes, (2) Lilik Indahwati, SST, M.Keb

Rhodamin B adalah salah satu pewarna sintetis yang masih banyak digunakan sebagai pewarna makanan, merupakan salah satu zat yang berbahaya apabila dikonsumsi. Rhodamin B memiliki ikatan klorin dan termasuk kedalam zat xenobiotik dapat meningkatkan radikal bebas. Ketidakseimbangan radikal bebas dengan antioksidan dapat menimbulkan stres oksidatif yang akibatnya dapat mengganggu lipid, protein, dan DNA yang mempengaruhi fungsi sel termasuk pengeluaran hormon dan dapat mengganggu siklus estrus. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh vitamin C, vitamin E, dan kombinasi vitamin C dan vitamin E terhadap siklus estrus menggunakan *study design true eksperimental*. Dua puluh lima tikus betina dewasa dibagi menjadi lima kelompok secara acak, yaitu kelompok kontrol negatif (tidak diberi perlakuan), kelompok rhodamin B, kelompok rhodamin B yang diberi vitamin C (600mg/KgBB), kelompok rhodamin B yang diberi vitamin E (40IU/KgBB), kelompok rhodamin B yang diberi vitamin E dan vitamin C. Rhodamin B diberikan secara oral dengan dosis 90 mg/KgBB selama 36 hari. Siklus estrus diamati dengan mengamati karakteristik apusan vagina saat pretest selama 2 kali siklus dan posttest 3 kali siklus. Data yang diperoleh dianalisis dan menunjukkan bahwa vitamin C, kombinasi vitamin C dan vitamin E berpengaruh signifikan ( $P < 0,05$ ), sedangkan vitamin E tidak berpengaruh signifikan ( $P > 0,05$ ). Kesimpulan dari penelitian ini adalah vitamin C dan kombinasi vitamin C dan vitamin E mampu memperlambat siklus estrus yang telah diberi rhodamin B, sedangkan vitamin E tidak mampu memperlambat siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B.

**Kata Kunci:** *Rhodamin B, siklus estrus, vitamin C, vitamin E*





## ABSTRACT

Setiawati, Maulida Diah. 2019. Protective Effect of Vitamin C and Vitamin E on Female Rat (*Rattus norvegicus*) Estrous Cycle which Received Rhodamin B. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes, (2) Lilik Indahwati, SST, M.Keb

Rhodamin B is a syntetic colour used for food colouring. Rhodamin B has a negative effect because rhodamin B has clorin binding and it is a xenobiotic can increase free radicals. Excessive free radicals without antioxidant can lead oxidative stress and its impact on lipid, protein, and DNA. Oxidative stress can disrupting hormonal balance and its impact on estrous cycle. This study is an experimental study aimed to investigated the effect of vitamin C, vitamin E, and combination of vitamin C and vitamin E to estrous cycle of rats exposed on rhodamin B. Twenty five female rats divided into five groups, including control negative (untreated group); rhodamin B group; rhodamin B group which received vitamin C(600mg/KgBB); rhodamin B group which received vitamin E(40 IU/KgBB), rhodamin B group which received vitamin E and vitamin C. Rhodamin B was given orally for 36 days. Estrous cycle were observed from vaginal smear for two cycles (pretest) and three cycles (posttest) . Data obtained was analysed and the result showed that vitamin C, combination vitamin C and E were significant ( $P < 0,05$ ), but vitamin E was not significant ( $P > 0,05$ ). The conclusion are vitamin C and combination of vitamin C and vitamin E can shorter the estrous cycle exposed on rhodamin B, but vitamin E cant shorter the estrous cycle exposed on rhodamin B

**Key words:** *Rhodamin B, estrous cycle, vitamin C, vitamin E*

**DAFTAR ISI**

Judul .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Abstrak .....	vii
Abstract .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Tabel .....	xiii
Daftar Singkatan .....	xiv
Daftar Lampiran .....	xv

**BAB 1. PENDAHULUAN**

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3

**BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Siklus Estrus .....	4
2.1.1 Definisi .....	4
2.1.2 Fase Siklus Estrus .....	4
2.2 Siklus Menstruasi .....	8
2.2.1 Definisi .....	8
2.2.2 Fase Siklus Menstruasi.....	9
2.3 Persamaan Perbedaan Siklus Estrus dengan Siklus Menstruasi .....	10
2.4 Pengukuran Siklus Estrus .....	12
2.5 Stres Oksidatif .....	14
2.6 Rhodamin B .....	16
2.6.1 Definisi .....	16
2.6.2 Karakteristik Rhodamin B .....	14
2.6.3 Logam Berat dalam Rhodamin B .....	15
2.6.4 Rhodamin B Menimbulkan Radikal Bebas dan Gangguan Sel .....	17





2.6.5 Pengaruh Rhodamin B terhadap Siklus Estrus .....	19
2.7 Vitamin C .....	20
2.7.1 Definisi .....	21
2.7.2 Vitamin C sebagai Antioksidan .....	21
2.6.3 Farmakokinetik Vitamin C .....	22
2.8 Vitamin E.....	22
2.8.1 Definisi .....	22
2.8.2 Vitamin E sebagai Antioksidan .....	23
2.8.3 Farmakokinetik Vitamin E .....	23
2.9 Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E.....	24

### **BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep.....	27
3.2 Keterangan Kerangka Konsep .....	28
3.3 Hipotesis Penelitian.....	29

### **BAB 4. METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian .....	30
4.2 Populasi dan Sampel .....	30
4.3 Variabel Penelitian .....	32
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	33
4.5 Bahan dan Alat Penelitian .....	33
4.6 Definisi Operasional .....	35
4.7 Prosedur Penelitian.....	34
4.8 Analisis Data .....	37
4.9 Alur Penelitian.....	39

### **BAB 5. HASIL PENELITIAN**

5.1 Karakteristik Hewan Percobaan .....	40
5.2 Analisis Data .....	43
5.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas .....	44
5.2.2 Hasil Analisis Perbandingan Siklus Estrus antarkelompok .....	45

### **BAB 6. PEMBAHASAN**

6.1 Pemberian Rhodamin B Memperpanjang Siklus Estrus .....	46
--	----



6.2 Pengaruh Pemberian Vitamin C, Vitamin E, Kombinasi Vitamin C dan E terhadap siklus Estrus Tikus yang Diberi Rhodamin B .....	48
6.3 Keterbatasan Penelitian .....	49

## **BAB 7. PENUTUP**

7.1 Kesimpulan .....	50
7.2 Saran .....	50

Daftar Pustaka .....	51
Lampiran .....	55





**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Sitologi Vagina Fase Proestrus..... 5

Gambar 2.2 Sitologi Vagina Fase Estrus..... 6

Gambar 2.3 Sitologi Vagina Fase Metestrus ..... 7

Gambar 2.4 Sitologi Vagina Fase Diestrus..... 8

Gambar 2.5 Siklus Menstruasi ..... 9

Gambar 2.6 Perbandingan Antara Siklus Estrus dan Siklus Menstruasi..... 12

Gambar 2.7 Observasi Vagina ..... 12

Gambar 2.8 Identification Tool Fase Siklus Estrus ..... 13

Gambar 2.9 Struktur Kimia Rhodamin B ..... 16

Gambar 2.10 Mekanisme Apoptosis Sel ..... 21

Gambar 2.11 Efek Antioksidan Vitamin C Menghambat Apoptosis ..... 22

Gambar 2.12 Efek Antioksidan Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E ..... 25

Gambar 5.1 Siklus Estrus Tikus ..... 42

Gambar 5.2 Grafik Rerata Delta Lama Siklus Estrus..... 44



**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Radikal dan Nonradikal .....	14
Tabel 4.1 Definisi Operasional .....	33
Tabel 5.1 Karakteristik Hewan Coba .....	39
Tabel 5.2 Rerata Lama Siklus Estrus Pretest dan Posttest .....	41
Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas .....	42





## DAFTAR SINGKATAN

- Asch** Ascorbic Acid  
**DNA** Deoxyribonucleic Acid  
**FSH** Follicle Stimulating Hormone  
**MDA** Malondialdehyd  
**LH** Luitenizing Hormone  
**LPO** Lipid Peroxydation  
**R** Radikal  
**RhB** Rhodamin B  
**RNS** Reactive Nitrogen Species  
**ROS** Reactive Oxygen Species  
**SOD** Superoxide Dismutase  
**Toch** Tocopherol



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Penelitian.....	55
Lampiran 2 Analisis Data.....	57
Lampiran 2 Surat Keterangan Laik Etik.....	60
Lampiran 3 Dokumentasi Penelitian.....	61
Lampiran 4 Curriculum Vitae.....	65





## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Rhodamin B adalah pewarna makanan yang banyak digunakan sebagai zat aditif makanan (Shen *et al.*, 2014). Rhodamin B juga termasuk pewarna makanan yang berbahaya menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 239/Men.Kes/Per/V/85 tentang zat warna.

Rhodamin B terbukti signifikan berpengaruh terhadap siklus estrus mencit betina. Siklus estrus mencit dipengaruhi oleh hormon. Terganggunya siklus estrus merupakan salah satu indikasi terjadinya gangguan hormon (Febrina dkk, 2013).

Rhodamin B merupakan zat asing bagi tubuh dan dapat menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas merupakan salah satu penyebab terjadinya infertilitas pada wanita (Cicek *et al.*, 2012).

Rhodamin B juga termasuk kedalam golongan xenobiotik. Xenobiotik adalah zat yang dapat menyebabkan kerusakan pada tubuh (Purnamawati dkk., 2015). Radikal bebas dibentuk oleh metabolisme xenobiotik secara normal (Yuslianti, 2018). Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga bersifat reaktif dan mampu mengoksidasi molekul disekitarnya (Wedhasari, 2014). Rhodamin B memicu stress oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan yang dapat memicu apoptosis sel di ovarium tikus dan mengganggu keseimbangan hormon (Laili dkk., 2015; Sulistina, 2014).



Antioksidan adalah salah satu zat yang dapat melawan efek buruk dari radikal bebas. Antioksidan yang dapat melawan efek buruk tersebut adalah vitamin E dan vitamin C. Vitamin C atau *ascorbat acid* adalah antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari efek radikal bebas, polusi, dan toksik. Vitamin C adalah vitamin yang diperlukan untuk berbagai proses fisiologis dalam tubuh. Vitamin C adalah antioksidan utama yang larut dalam air, plasma, dan jaringan. Vitamin C dapat mendukung daur ulang redoks dari  $\alpha$ -tokoferol (Combs, 2017).

Vitamin E sebagai antioksidan telah terbukti dapat mempengaruhi ketebalan endometrium dan mengobati wanita dengan masalah infertilitas (Cicek *et al*, 2012). Menurut Sharma *et al.*, (2012) dikatakan bahwa efektivitas kombinasi vitamin E dan C lebih besar dibanding vitamin E atau vitamin C yang diberi sendiri. Kombinasi vitamin C dan vitamin E juga memiliki sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal (Yuslianti, 2018).

Penggunaan rhodamin B dalam jangka panjang dapat menyebabkan stress oksidatif, sehingga dapat mengganggu kinerja hormon pada sistem reproduksi seperti FSH, LH, progesteron, dan estrogen (Febrina dkk., 2013). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan terhadap siklus estrus pada tikus yang telah terpapar rhodamin B.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian vitamin C dan vitamin E berpengaruh terhadap lama siklus estrus tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diberi rhodamin B?





### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E berbagai dosis terhadap lama siklus tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diberi rhodamin B

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian rhodamin B dengan terhadap lama siklus estrus tikus
2. Menganalisis pengaruh pemberian vitamin C terhadap lama siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B
3. Menganalisis pengaruh pemberian vitamin E terhadap lama siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B
4. Menganalisis pengaruh pemberian kombinasi vitamin C dan E terhadap lama siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

Diharapkan dapat digunakan sebagai dasar ilmu pengembangan terkait pengaruh vitamin C dan vitamin E terhadap lama siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Diharapkan dapat menjadi sumber informasi bagi masyarakat dan praktisi kesehatan tentang konsumsi makanan yang mengandung rhodamin B
2. Vitamin C dan vitamin E sebagai dapat digunakan sebagai antioksidan terhadap pengaruh rhodamin B



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Siklus Estrus

##### 2.1.1 Definisi

Siklus estrus adalah siklus reproduksi yang ditemui pada hewan betina yang tidak hamil. Siklus ini disebut siklus menstruasi, yang mempunyai hubungan erat dengan perubahan hormon yang terjadi pada organ reproduksi. Siklus ini memiliki 4 fase yaitu, proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Sari, 2013).

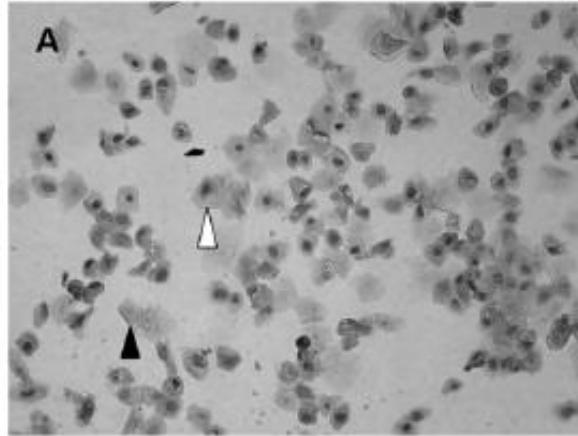
##### 2.1.2 Fase Siklus Estrus

Menurut *Life Science Weekly* (2013) siklus estrus menggambarkan siklus menstruasi pada wanita. Siklus estrus ditandai dengan terjadinya perubahan hormon secara fisiologis dimana dapat dibedakan menjadi empat fase yaitu:

##### 1. Proestrus

Proestrus merupakan periode sebelum hewan mengalami estrus, pada saat *folikel de graff* tumbuh akibat pengaruh FSH dan jumlah estradiol semakin bertambah (Sumarmin, 2015). Fase ini ditandai dengan regresi korpus luteum yang berkembang pada fase sebelumnya. Ketika korpus luteum mengalami regresi, terjadi penurunan progesteron. Ketika terjadi penurunan progesteron maka terjadi peningkatan produksi *follicle stimulating hormon* (FSH), yang menstimulasi pertumbuhan folikel, pada fase ini juga terjadi peningkatan level estradiol (*Life Science weekly*, 2013).



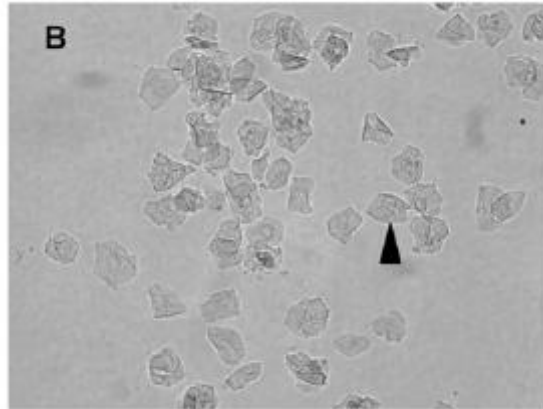


Gambar 2.1 Sitologi Vagina Fase Proestrus. Epitel nucleate ditunjukkan oleh panah putih, epitel terkornifikasi ditunjukkan oleh panah hitam (Byers *et al.*, 2012)

Gambar 2.1 Selama fase proestrus, sel yang paling banyak adalah sel nuklease dengan beberapa sel epitel terkornifikasi. Sel nuklease berbentuk lonjong dan bergerombol (Hood, 2016). Fase ini jarang terdapat leukosit dan dikelilingi oleh sel nuklease yang dominan (Honigerg, 1990). Sel epitel nuklease adalah sel-sel epitel berinti, fase ini merupakan fase yang siap untuk perkawinan. Folikel akan merangsang perubahan pada saluran reproduksi berupa terjadinya sekresi mukus yang tebal dan berlendir, epitel vagina mengalami penebalan dan vaskularisasi (Sumarmin, 2015). Proestrus berakhir dalam 8-12 jam (Hood, 2016).

## 2. Fase Estrus

Fase estrus ditandai dengan dua periode. Periode pertama adalah peningkatan estradiol yang menyebabkan produksi *luteinizing hormon* (LH), dimana estradiol akan terus meningkat dan akan mengalami penurunan hingga LH berada pada level tertinggi atau puncak. Periode kedua pada siklus estrus berlangsung selama LH pada puncak tertinggi hingga terjadi ovulasi. Selama periode kedua ini kehamilan seringkali terjadi.



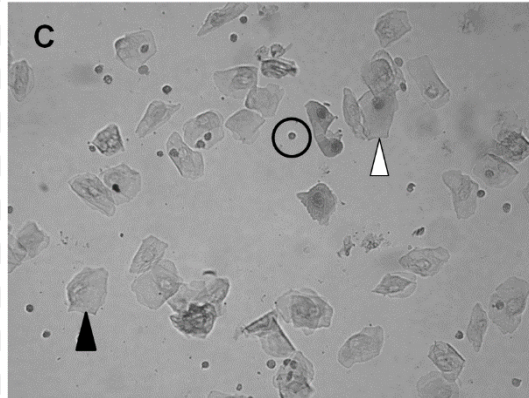
Gambar 2.2 Sitologi Vagina Fase Estrus. sel epitel terkornifikasi ditunjukkan oleh panah hitam (Byers *et al.*, 2012)

Gambar 2.2 menunjukkan pada fase estrus sel-sel epitel vagina sebagian besar adalah sel-sel yang terkornifikasi atau epitel yang tidak berinti. Selain itu, pada apusan vagina juga ditemukan adanya mukus atau lendir (Sumarmin, 2015). Epitelium akan terkornifikasi, layer yang terkornifikasi akan menjadi jelas, diikuti dengan masuknya leukosit atau tidak ada leukosit (Honibberg, 1990). Sel epitelium terkornifikasi ini memiliki bentuk ireguler dan mungkin terdapat nukelus. Fase estrus berakhir dalam 10-15 jam (Hood, 2016).

### 3. Metestrus

Metestrus adalah periode inaktivitas seksual. Korpus luteum akan mulai berkembang dan level progesteron akan meningkat. Estradiol juga meningkat pada fase metestrus. Metestrus berakhir hingga permulaan fase diestrus (Honigerg, 1990).



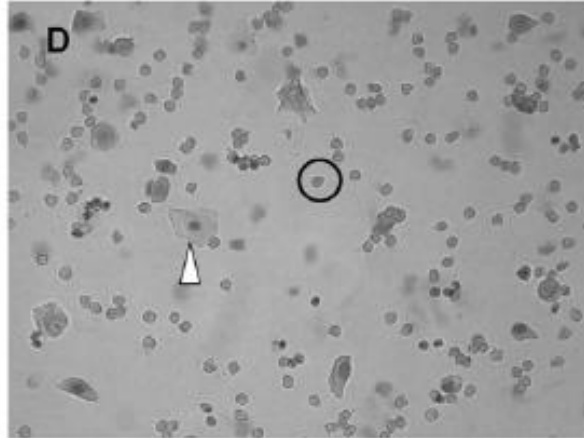


Gambar 2.3 Sitologi Vagina Fase Metestrus. leukosit ditunjukkan oleh lingkaran, sel epitel terkornifikasi ditunjukkan oleh panah hitam, dan sel epitel nuclease ditunjukkan oleh panah putih (Byers et al, 2012)

Gambar 2.3 merupakan fase metestrus dimana ditemukan beberapa leukosit namun jarang terdapat sel epitel kornifikasi dan sel squamosa nuklease (Honigberg, 1990). Terdapat beberapa leukosit namun jarang terdapat sel epitel kornifikasi dan sel squamosa nuclease. Sel epitel dikelilingi oleh leukosit. Jumlah Leukosit akan meningkat pada fase ini. Metestrus adalah fase terpendek, Berakhir dalam waktu kurang lebih 6 jam (Hood, 2016).

#### 4. Diestrus

Fase diestrus, estradiol akan bervariasi namun relatif rendah hingga fase proestrus, dimana korpus luteum akan ruptur dan dapat menyebabkan progesteron turun, sedangkan kadar estradiol kembali berangsur meningkat ke level maksimalnya. Siklus ini akan berulang dengan sendirinya.



Gambar 2.4 Sitologi Vagina Fase Diestrus, lingkaran menunjukkan leukosit, panah putih menunjukkan sel epitel nuklease (Byers *et al.*, 2012)

Gambar 2.4 menunjukkan keadaan sel-sel epitel vagina mulai pulih kembali. Hal ini terlihat dengan mulai banyaknya sel epitel nuklease pada apusan vagina (Sumarmin, 2015). Selama periode ini, sel epitel nuklease menjadi lebih lonjong. Disestrus adalah fase terpanjang, berakhir pada 2 sampai 3 hari (Hood, 2016).

## 2.2 Siklus Menstruasi

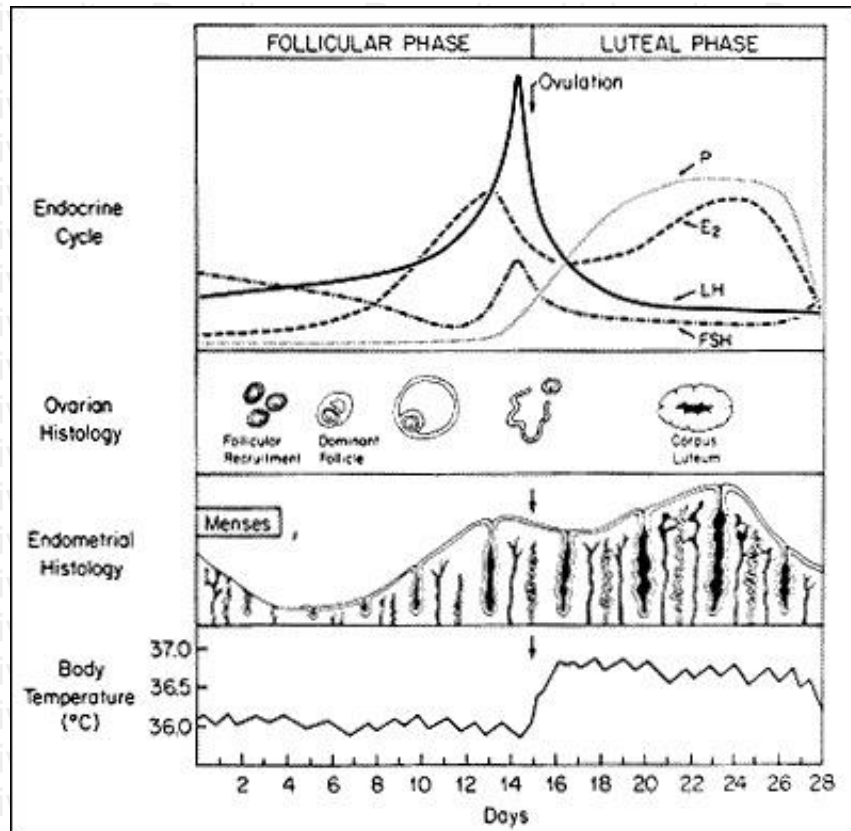
### 2.2.1 Definisi

Menstruasi adalah pendarahan vagina secara berkala akibat terlepasnya lapisan endometrium uterus. Fungsi menstruasi normal adalah interaksi antara hipotalamus, hipofisis, dan ovarium (Indah, 2012). Menstruasi dianggap sebagai indikator kesehatan reproduksi. Perubahan pada siklus menstruasi dapat mempengaruhi kualitas hidup wanita (Milanti dkk, 2017).





## 2.2.2 Fase Siklus Menstruasi



Gambar 2.5 Siklus Menstruasi. Perubahan Hormon, Folikel, Endometrium, dan Suhu Tubuh pada Siklus Menstruasi (Reed *et al.*, 2018)

Gambar 2.5 menunjukkan perubahan yang terjadi pada siklus menstruasi.

Siklus menstruasi terjadi rata-rata selama 28 hari. Hari pertama siklus adalah hari pertama saat menstruasi hingga bertemu menstruasi berikutnya. Siklus menstruasi terdiri dari beberapa fase berikut (Naish dan Court, 2015):

### 1. Fase Menstruasi

Fase pertama menstruasi, folikel akan mengeluarkan estrogen akibat pengaruh LH. LH bekerja pada sel theca untuk menstimulasi produksi hormon estrogen.



## 2. Fase Poliferatif

Folikel terus memproduksi estrogen dan memicu pertumbuhan dan vaskularisasi endometrium. Folikel berkembang sangat cepat pada fase ini, membentuk folikel antrum yang berisi cairan dimana didalamnya terdapat oosit matur.

## 3. Fase Ovulasi

LH dan FSH terus meningkat, meningkatkan produksi estradiol, yang memberikan feedback negative ke hipotalamus. LH pada puncak tertinggi memicu ovulasi. Ovulasi adalah proses oosit matur keluar dari ovarium dan berjalan menuju tuba fallopi.

## 4. Fase Luteal

Fase ini berakhir pada 14 hari setelah oosit terfertilisasi. Didominasi oleh korpus luteum dan progesteron. Folikel akan ruptur dan berisi darah, LH dan FSH turun akibat adanya ovulasi. Progesteron terus meningkat. Progesteron penting untuk vaskularisasi pada uterus. Apabila korpus luteum tidak terfertilisasi selama 14 hari setelah ovulasi, yang terjadi adalah ruptur, dan menstruasi.

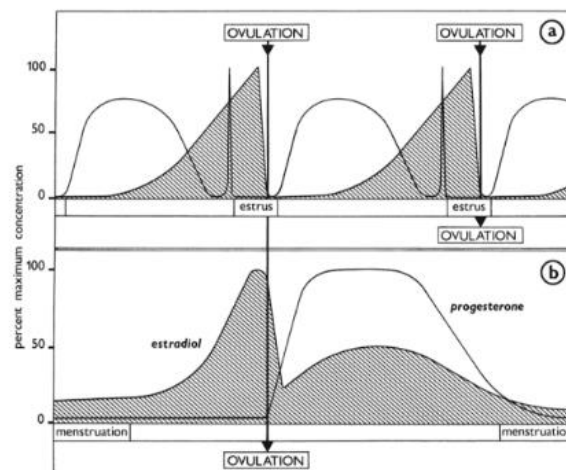
### 2.3 Persamaan dan Perbedaan Siklus Estrus dengan Siklus Menstruasi

Menurut Honigerg (1990) siklus menstruasi dan siklus estrus memiliki siklus yang sama. Keduanya memiliki hubungan yang kompleks dengan hipotalamus (faktor pengeluaran), pituitary (gonadotropin), dan ovarium (estrogen, progesteron). Keduanya memiliki periode *preovulatory follicular* yang dominan oleh estrogen dan periode *postovulatory follicular* yang dikontrol oleh progesteron.



Berikut adalah perbedaan antara siklus estrus dan siklus menstruasi (Honigerg, 1990):

1. Pada siklus estrus fase estrus ditandai oleh daya penerimaan seksual yang bisa direlaksikan dengan ovulasi. Pada menstruasi penerimaan seksual tidak dibatasi dan ovulasi terjadi pada pertengahan siklus.
2. Pada siklus estrus, respon endometrium uterus terhadap progesteron tidak terlalu berdampak, pada fase itu perkembangan endometrium diikuti oleh proses penebalan tanpa peluruhan dan perdarahan. Pada fase menstruasi, penebalan endometrium distimulasi oleh hormon progesteron diikuti dengan peluruhan endometrium dan perdarahan setelah level progesteron menurun.
3. Sementara pada puncak *preovulatory* (sebelum ovulasi) progesteron akan meningkat, estrogen juga meningkat, dimana akan membentuk timbal balik positif untuk sekresi gonadotropin yang dibutuhkan untuk memulai ovulasi. Hal ini tidak terjadi pada siklus menstruasi, dimana hanya estrogen yang dapat memicu ovulasi dan memicu gonadotropin.
4. Siklus estrus pada hewan lebih pendek dibandingkan siklus menstruasi pada manusia.



Gambar 2.6. Perbandingan antara siklus estrus dan siklus menstruasi (Honigerg, 1990)



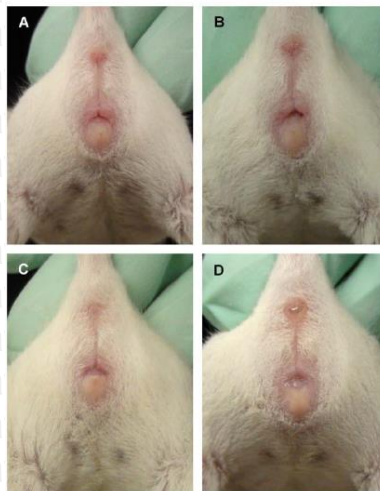
Gambar 2.6 menunjukkan perbedaan siklus estrus dan siklus menstruasi.

Siklus estrus relatif lebih pendek. Fase estrus pada siklus estrus adalah saat ovulasi. Setelah ovulasi terjadi pada fase estrus, level estradiol akan turun drastis hingga nol. Berbeda dengan siklus menstruasi yang memiliki waktu siklus lebih panjang. Pada siklus menstruasi ovulasi terjadi pada pertengahan siklus.

Penurunan progesteron terjadi pada akhir fase luteal memicu perdarahan. Kadar estradiol setelah ovulasi relatif dipertahankan diseluruh siklus. Terjadi peningkatan progesteron pada fase luteal pada kedua siklus, namun pada siklus estrus terjadi peningkatan progesteron selama ovulasi, hal ini berbeda dengan apa yang terjadi pada siklus menstruasi (Honigerg, 1990).

#### 2.4 Pengukuran Siklus Estrus

Mengukur siklus estrus dapat dengan beberapa cara, yang pertama dengan observasi dengan melihat terbukanya vagina pada setiap siklus, kedua dengan sitologi vagina, ketiga dengan memasang tikus dan melihat apakah ada *vaginal clothing* keesokan harinya (Byers *et al.*, 2012)



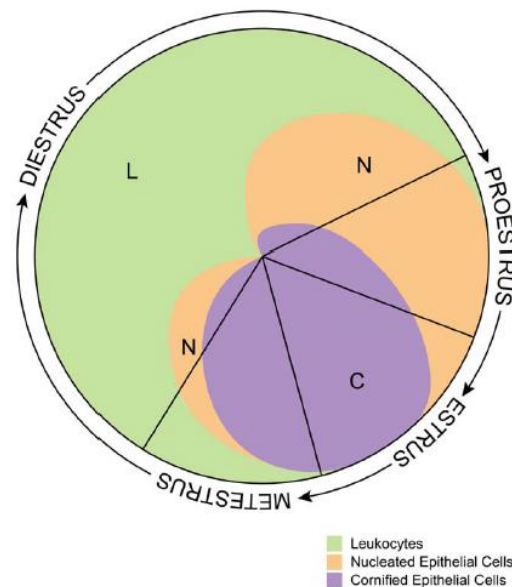
Gambar 2.7 Observasi Vagina (Byers *et al.*, 2012)





Gambar 2.7 menunjukkan empat fase pada tikus albino strain (A) proestrus, (B) estrus, (C) metestrus, dan (D) diestrus. Evaluasi setiap fase pada siklus estrus dilakukan dengan cara mengangkat ekor tikus dan mengamati secara langsung. Perlu diperhatikan pencahayaan yang tepat karena menentukan bagaimana cara menilai warna jaringan pada vagina (Byers *et al.*, 2012).

Siklus estrus dievaluasi melalui sampel sel vagina yang diikuti dengan penilaian sitologi. Perubahan siklus pada fase estrus ditentukan dengan tipe sel yang mendominasi yang diamati melalui mikroskop. Durasi setiap periodenya bervariasi, fase paling panjang adalah fase diestrus yaitu 60-70 jam. Periode estrus 10-15 jam, dimana periode ini terjadi kopulasi antara tikus betina dan jantan (Faqi, 2017).



Gambar 2.8 *Identification Tool* Fase Siklus Estrus. Alat identifikasi ini untuk memudahkan dalam mengetahui tipe sel dan proporsinya pada setiap fase siklus estrus (Byers *et al.*, 2012)

Untuk menentukan siklus estrus pada tikus, dilakukan vaginal swab setiap hari. Berbagai metode digunakan untuk mengevaluasi siklus estrus. Penelitian dalam laboratorium mengukur rata-rata panjang siklus dengan mengukur siklus



estrus secara utuh. Tipe sel dan pergerakan leukosit selama siklus estrus dikontrol oleh hormon (Hood, 2016).

## 2.5 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah salah satu kondisi dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Radikal bebas memiliki satu elektron yang tidak berikatan dan sangat reaktif, sehingga dapat mengambil, memberi, atau membentuk ikatan baru dan dapat mengganggu fungsi sel (Olieviera, 2014).

Terdapat dua jenis radikal bebas yaitu ROS (Reactive Oxygen Species) dan RNS (Reactive Nitrogen Species) (Agarwal, 2012). Berdasarkan sumbernya dibagi menjadi 2 yaitu, eksogen dan endogen. eksogen dapat berasal dari radiasi, ultrasound, makanan, obat-obatan, polusi, xenobiotik, toksin. Endogen dapat berasal dari sel, metabolisme mitokondria, xanthin oksidase, dan NO sintase (Kohen dan Nyska, 2002). Radikal bebas memiliki satu elektron yang tidak berikatan dan sangat reaktif, ada konsentrasi yang rendah, dibutuhkan untuk proses fisiologis sel, namun konsentrasi yang tinggi dapat mengganggu lipid, protein, dan DNA sel (Birben et al, 2012; Gulati, 2017). Radikal bebas dapat diklasifikasikan menjadi 2 grup, yaitu radikal dan non radikal.

Tabel 2.1 Radikal dan Nonradikal (Kohen dan Nyska, 2002)

Nama		Simbol
Oxygen (bi-radikal)		$O_2^{\cdot\cdot}$
Ion Superoksida		$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil	Radikal Oksigen	$OH^{\cdot}$
Peroksil		$ROO^{\cdot}$
Alkoksil		$RO^{\cdot}$
Nitric oksida		$NO^{\cdot}$
Hydrogen Peroksida		$H_2O_2$
Organic peroksida		$ROOH$
Hipoklorus Acid		$HOCL$
Ozone	Oksigen nonradikal	$O_3$
Aldehid		$HCOR$
Singlet Oksigen		$^1O_2$
Peroksinitrit		$ONOOH$





Radikal memiliki masa hidup yang singkat ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ ) dan reaktivitas yang tinggi (Kohen dan ,2002; Widayati). Terdapat berbagai macam ROS, namun yang memiliki rekatifitas tinggi dan berbahaya adalah superoksida ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH^\cdot$ ), dan peridroksil ( $H_2O_2$ ) (Widayati, 2019). Menurut Agarwal (2012) radikal bebas dapat menyebabkan nekrosis dan kematian sel melalui mekanisme sebagai berikut,

- a. Membuka chanel ion: ROS yang berlebihan memicu pengeluaran  $Ca^{2+}$ , yang berdampak pada terganggunya permeabilitas membrane mitokondria, akibatnya adalah membran mitokondria menjadi tidak stabil dan produksi ATP menurun.
- b. Peroksidasi lipid: Reaksi ROS terhadap PUFA membrane sel dan plasma lipoprotein dapat menyebabkan terbentuknya MDA, yang dapat memodifikasi protein dan DNA (Widayati, 2019). Dimana PUFA dapat bereaksi dengan  $O_2$ , memproduksi peroksil radikal yang dapat mengikat  $H^+$  dari fatty acid yang lain, sehingga terjadi reaksi yang terus-menerus. Vitamin E dapat menghentikan reaksi ini karena dapat larut dalam lemak
- c. Modifikasi protein: amino acid adalah target kerusakan oksidatif. Oksidasi secara langsung dapat memicu pembentukan grup karbonil.
- d. Oksidasi DNA: DNA mitokondria dapat mengalami kerusakan karena jumlah protein histone kurang, dan tidak adanya mekanisme perbaikan.

## 2.6 Rhodamin B

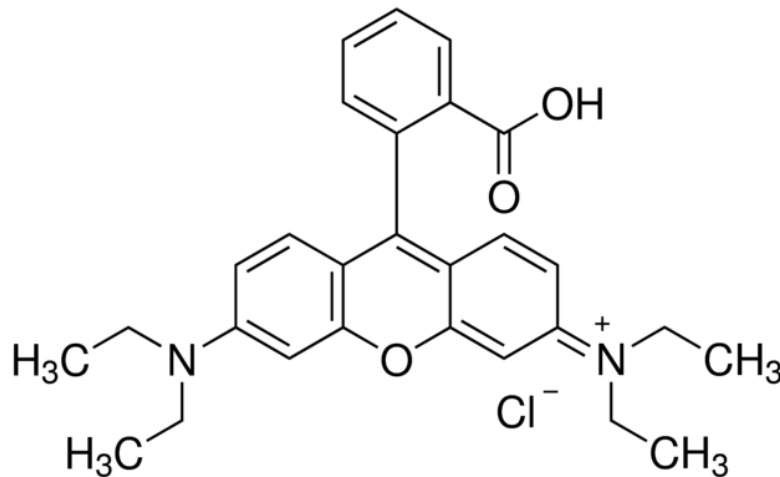
### 2.6.1 Definisi

Rhodamin B adalah pewarna makanan yang dilarang. Rhodamin B berbentuk serbuk kristal berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, dan



mudah larut. Makanan yang dicampuri rhodamin B akan berwarna merah muda terang (Yamlean, P, 2011). Rhodamin B (RhB), Basic violet 10, adalah pewarna yang larut dalam air dan berasal dari kelas xanthene (Merouani dkk, 2010).

### 2.6.2 Karakteristik Rhodamin B



Gambar 2.9. Struktur Kimia Rhodamin B (sigma Aldrich C.I 45170)

Rhodamin B atau *basic violet 10* memiliki kelas kimia *xanthene* dengan molekul formula  $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$  (Sigma Aldrich; Merouani dkk., 2010). Rhodamin B juga termasuk kedalam golongan xenobiotik. Xenobiotik adalah zat yang dapat menyebabkan kerusakan pada tubuh. Rhodamin B mengandung gugus amino bersifat basa dan inti benzen, Rhodamin B termasuk senyawa yang sulit didegradasi oleh mikroorganisme secara alami. Rhodamin B dalam tubuh manusia dapat menimbulkan iritasi saluran pernafasan, kulit, mata, saluran pencernaan, keracunan dan kanker hati (Purnamawati dkk., 2015).

### 2.6.3 Rhodamin B Menimbulkan Radikal Bebas dan Gangguan Sel

Rhodamin B adalah pewarna makanan yang termasuk kedalam golongan xenobiotik. Radikal bebas dibentuk oleh metabolisme xenobiotik secara normal.





Radikal bebas adalah suatu atom, gugus, atau senyawa yang dapat berdiri sendiri memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit paling luar. Kehadiran satu atau lebih elektron tidak berpasangan menyebabkan molekul ini mudah tertarik dan menyebabkan molekul sangat reaktif (Yuslianti, 2018).

Tubuh akan mempertahankan selnya dari kerusakan dengan cara enzimatik dan non enzimatik. Pertahanan ini dengan cara menjaga keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan sistem pertahanan radikal bebas yang biasa disebut *scavenger* (Astuti dkk, 2009). Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga bersifat reaktif dan mampu mengoksidasi molekul disekitarnya (lipid, protein, DNA, dan karbohidrat) (Wedhasari, 2014).

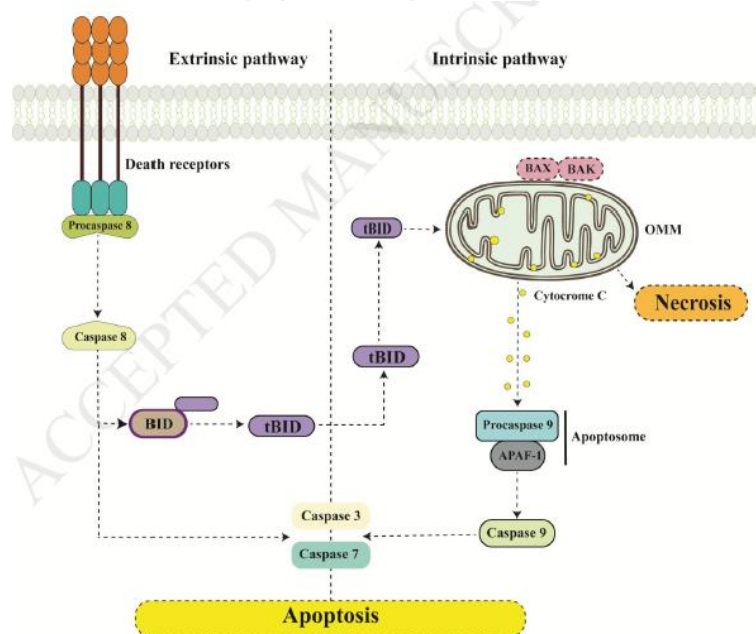
ROS (Reactive Oxygen Species) adalah salah satu radikal bebas yang penting dalam proses fisiologis tubuh yang merupakan hasil metabolisme xenobiotik (Astuti dkk, 2009). Pada metabolisme xenobiotik dihasilkan ROS dengan cara aktivasi sitokrom P450 (Rezende *et al.*, 2017).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa paparan rhodamin B memicu stress oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Rhodamin B dapat meningkatkan hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) dan singlet oksigen  $^1\text{O}_2$  (Mohamed, 2018). Selain itu, metabolisme xenobiotik rhodamin B dapat mengaktivasi sitokrom P450 memproduksi ROS yaitu hidroksil peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) (Rezende *et al.*, 2017; Zangar *et al.*, 2004).

Penelitian membuktikan bahwa Rhodamin B dapat menyebabkan peroksidasi lipid, dapat meningkatkan MDA dan menurunkan level SOD dalam ovarium tikus betina secara signifikan (Laili dkk.,2015). MDA adalah produk akhir dalam proses peroksidasi lipid yang disebabkan oleh reaksi radikal bebas pada lemak tak jenuh

dan membran sel (Jovanovic *et al.*, 2012). Keadaan ini dapat mengganggu folikel ovarium dan dapat menurunkan jumlah folikel primer, sekunder, dan graafian (Laili dkk., 2015).

Apoptosis sel adalah kematian sel karena sel mengalami kerusakan. Proses ini penting untuk mencegah kerusakan lebih lanjut seperti kerusakan DNA, sebagai upaya pencegahan kanker (Durtodoir, 2016).



2.10 Mekanisme Apoptosis Sel (Mohajeri, 2018)

Rhodamin B dapat meningkatkan BAX menurunkan BCL<sub>2</sub> yang memicu apoptosis pada region hptalamus (Sulistina, 2014). Apoptosis dapat terjadi karena perubahan pada membrane mitokondria yang disebabkan oleh peroksidasi lipid, sehingga akan memicu pengeluaran sitokrom C, apabila sitokrom C berikatan dengan APAF1 dan pro-caspase 9 akan membentuk apoptosom, yang dapat memicu caspase lain (caspase 3 dan caspase 7), yang dapat menyebabkan disintegrasi sel (Mohajeri, 2018). ROS juga dapat mengaktifkan tumor supresor protein p53. P53 memiliki peran untuk mengontrol





respon sel, memicu sel untuk perbaikan dan bertahan, atau mati dengan apoptosis. Pada kondisi normal p53 memiliki waktu yang pendek (Durtodoir *et al.*, 2016).

Apoptosis sel adalah kematian sel yang dapat di stimulasi oleh proses fisiologis maupun patologis. Penelitian sebelumnya menyebutkan, ROS dapat dengan mudah menerima dan memberikan elektron melalui reaksi reduksi oksidasi. ROS tersebut dapat ditemukan di nukleus dan membran sel yang dapat merusak molekul-molekul biologis yang relevan seperti DNA, protein, karbohidrat, dan lipid. Radikal bebas dapat menyerang makromolekul yang penting yang dapat memicu kerusakan sel dan gangguan hemostatis (Hadi, 2011).

Menurut Ripaldy (2017) dalam struktur rhodamin B juga terdapat klorin (Cl) yang merupakan senyawa halogen yang mudah bereaksi, dan memiliki reaktivitas yang tinggi. Rhodamin B memiliki ikatan klorin yang dapat menjadi reproduksi toksikan. Kondisi ini dapat mengganggu pengeluaran estrogen, dimana estrogen memiliki hubungan timbal balik antara gonad dan otak, dan dapat mengganggu ovulasi. Selain itu, dapat mengganggu sintesis neurotransmitter pada hipotalamus sehingga dapat mengganggu regulasi neuroendokrin pada hipotalamus, dampaknya adalah gangguan peningkatan LH, sehingga mengganggu hubungan timbal balik LH-estrogen, menunda ovulasi, dan mengganggu kesuburan (Woldersmekker, 2004).

### **2.6.5 Pengaruh Rhodamin B dengan Siklus Estrus**

Siklus estrus adalah siklus reproduksi pada tikus, siklus ini dipengaruhi oleh hormon, ovarium, dan vagina. Terganggunya siklus estrus merupakan indikator terjadinya gangguan pada organ-organ tersebut (Woldersmekel, 2004).

Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan bahwa MDA meningkat yang



terdapat dalam ovarium dapat menyebabkan gangguan pada ovarium, berkurangnya jumlah sel di ovarium (Jovanovic *et al.*, 2012). Apoptosis sel di ovarium juga dapat berpengaruh terhadap gangguan hormon esterogen dan progesteron, aktifitas sitokrom P450 yang memicu ROS dapat menyebabkan apoptosis sel (Dutordoir *et al.*, 2016). Ketidakseimbangan BAX dan BCL regio hipotalamus dapat memicu apoptosis memicu penurunan kadar FSH dan LH (Sulistina, 2014).

Rhodamin B dengan dosis 150 ppm, 300 ppm, dan 450 ppm, signifikan berpengaruh terhadap siklus estrus. Hal ini dapat terjadi akibat gangguan pada sekresi hormon oleh pituitary yaitu FSH dan LH yang akan mempengaruhi ovarium dalam pengeluaran esterogen dan progesteron. Siklus estrus adalah siklus yang dipengaruhi oleh hormon. Apabila terjadi gangguan pada siklus estrus, maka dapat dipastikan terjadi gangguan hormonal dalam tubuh (Febriana, 2013). Sulistina (2014) menyebutkan bahwa rhodamin B dengan dosis 4,5 mg/200gBB, 9 mg/200gBB, dan 18 mg/200gBB dapat mengganggu keseimbangan hormon dan memicu apoptosis sel.

## **2.7 Vitamin C**

### **2.7.1 Definisi**

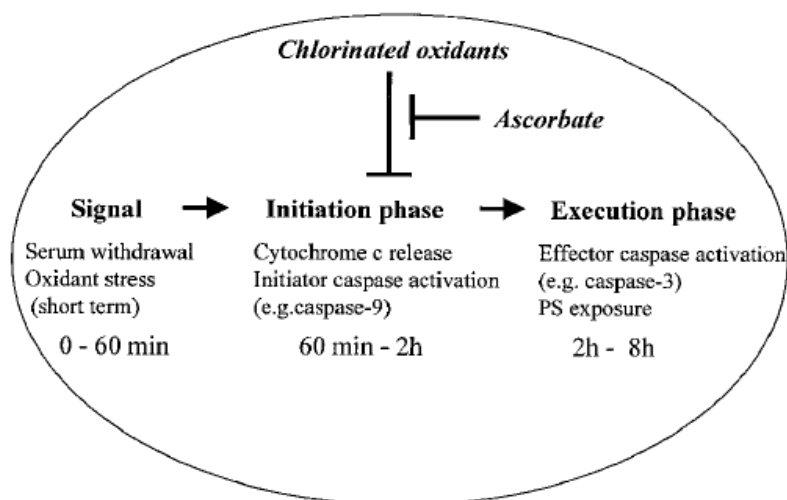
Vitamin C adalah vitamin yang tidak dapat diproduksi didalam tubuh sehingga diperlukan suplementasi yang berasal dari luar tubuh. Tubuh memerlukan vitamin C untuk proses fisiologis secara normal. Vitamin C membantu sintesis dan metabolisme tirosin, asam folat, tritopfan, dan hidroksilasi glisin, prolin, lisin karnitin, dan katekolamin (Chambial, 2013). Makanan yang mengandung vitamin C dapat dengan mudah rusak karena efek penyimpanan dan pengolahan sehingga diperlukan suplementasi dari luar (Combs, 2017).



Vitamin C atau *ascorbat acid* adalah vitamin yang diperlukan untuk berbagai proses fisiologis dalam tubuh. Vitamin C adalah antioksidan utama yang larut dalam air, plasma, dan jaringan. Vitamin C dapat mendukung daur ulang redoks dari  $\alpha$ -tokoferol. Manfaat lain dari vitamin C adalah dapat menurunkan hipertensi, atherogenesis, komplikasi diabetes, pilek, infeksi, dan kanker (Combs, 2017).

### 2.7.2 Vitamin C sebagai Antioksidan

Menurut berbagai penelitian vitamin C bersama dengan mikronutrien lain dapat mengatasi kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Chambial, 2013). Sebagai antioksidan, vitamin C melindungi tubuh dari berbagai efek radikal bebas, polusi, dan racun. Vitamin C biasa dikonsumsi dalam jumlah besar karena memiliki banyak manfaat namun efek toksiknya jarang ditemui. Vitamin C adalah agen pereduksi yang kuat. Ketiga struktur kimianya merupakan penangkap radikal bebas efektif seperti singlet oksigen ( $^1\text{O}_2$ ). Vitamin C juga dapat mereduksi ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) menjadi ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ), radikal superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) menjadi  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Combs, 2017).



Gambar 2.11 Vitamin C dapat menghambat apoptosis pada paparan klorin (Vissers, 2001).

Vitamin C dapat menghambat klorin oksidan seperti HOCl yang dapat mengganggu mitokondria yang mengakibatkan lepasnya sitokrom C yang dapat bereaksi dengan Apaf 1 mengaktifasi caspase 9, aktivasi caspase 9 dapat mengaktifasi caspase 3 yang dapat memicu apoptosis sel (Vissers, 2001).

### 2.7.3 Farmakokinetik Vitamin C

Efektifitas konsentrasi vitamin C bergantung pada keefektifitasan absorpsi vitamin C dari usus hingga ekskresi pada ginjal. Vitamin C dikonsumsi sebagai suplemen akan diserap oleh sel epitel yang berada pada usus halus selanjutnya akan berdifusi melalui pembuluh kapiler dan beredar keseluruh tubuh. Sirkulasi selanjutnya ketika vitamin C beredar keseluruh tubuh melalui sistem peredaran darah, Vitamin C akan melalui proses filtrasi di kapiler ginjal ke kapsula bowman melalui mekanisme filtrasi secara umum. Setelah melalui proses filtrasi vitamin C akan diserap kembali atau reabsorpsi melalui transportasi SVCT1 pada tubulus proksimal. Penyerapan di usus dan ekskresi ginjal mengontrol jumlah vitamin C dan keefektifannya. Pada konsentrasi tinggi, SVCT1 akan menurunkan regulasinya hingga mencapai batas jumlah vitamin C yang diserap di usus dan ginjal, sehingga vitamin C tidak terserap seluruhnya (Chambial, 2013).

Dosis konsumsi vitamin C perhari adalah 15-200mg. Vitamin C secara umum tidak beracun, namun konsumsi dosis tinggi 2-6g/hari dapat menyebabkan gangguan pada gastrointestinal dan diare. Masalah ini dapat diatasi dengan mengurangi konsumsi vitamin C (Chambial, 2013). Pada manusia dengan dosis 200 mg vitamin C sepenuhnya akan diabsorpsi, namun pada dosis 1000 mg efisiensi menurun menjadi 50% (Combs, 2017). Vitamin C dengan dosis 0,4 mg/gBB dan 0,8 mg/gBB terbukti mampu menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium yang diberi rhodamin B (Laili, 2015).







## 2.8 Vitamin E

### 2.8.1 Definisi

Vitamin E adalah antioksidan kuat yang memiliki kemampuan antiinflamasi pada jaringan (Tahan, 2011). Vitamin E memiliki kemampuan untuk melewati lemak yang memiliki fungsi sebagai antioksidan termasuk melindungi struktur kaya lemak seperti otak dari kerusakan akibat radikal bebas (Hasan *et al*, 2010). Pada studi sebelumnya ditemukan bahwa *α-tocopherol* merupakan antioksidan dengan bioavailabilitas terbesar dan telah terbukti sebagai antioksidan terpenting yang dapat menembus lemak (Lobo, 2010).

Vitamin E adalah vitamin yang memiliki peran penting dalam metabolisme sel. Fungsinya berkaitan dengan perlindungan dan perlawanan terhadap kerusakan sel akibat ROS (Combs, 2017).

### 2.8.2 Vitamin E sebagai Antioksidan

Vitamin E sebagai antioksidan berperan dalam donor hidrogen, donor elektron, enzim inhibitor, dan sebagai detoks ROS baik enzimatik maupun nonenzimatik. Mekanisme antioksidan ada 2 cara, pertama antioksidan akan memecah mekanisme dengan cara donasi elektron kepada radikal bebas yang ada pada sistem. Kedua, antioksidan akan melanjutkan sistem biologinya melalui mekanisme yang berbeda-beda termasuk dalam donasi elektron, co-antioksidan, gen ekspresi regulasi (Lobo, 2010).

Vitamin E dapat menghilangkan efek radikal bebas yang sedang dan mencegah reaksi ROS yang terus menerus. Reaksi ini menghasilkan *α-tocopherol* oksidasi radikal yang dapat di daur ulang menjadi reduksi aktif oleh antioksidan yang lain seperti askorbat, retinol, atau ubiquinol (Lobo, 2010).



### 2.8.3 Farmakokinetik Vitamin E

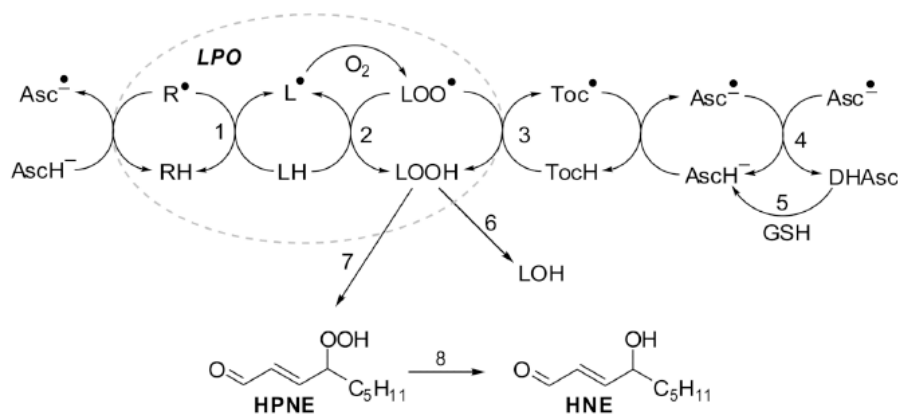
Vitamin E tidak larut dalam air sehingga vitamin E bergantung pada pembawanya atau pelarut ke jaringan. Tidak seperti vitamin A dan D, vitamin E tidak memiliki protein pembawa yang spesifik ke plasma. Vitamin E ditransfer dari kilomikra ke lipoprotein plasma yang mengikat secara tidak spesifik. Vitamin E ditransfer ke liver dengan *trigecylcerida* yang kaya kilomikra. Vitamin yang berada pada membran parenkim sel akan dibawa oleh sirkulasi lipoprotein (Combs, 2017).

### 2.9 Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E

Sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa-senyawa ROS dapat dibagi menjadi dua yaitu sistem pertahanan preventif dan sistem pertahanan melalui pemutusan rantai reaksi radikal. Vitamin C dan vitamin E memiliki sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal. Vitamin E bereaksi dengan radikal lipid membran sel. membentuk vitamin E radikal yang dapat memutus reaksi rantai radikal. Vitamin C merupakan antioksidan yang dapat mengikat radikal bebas vitamin E dengan menjadi donor elektron (Yuslianti, 2018).

Vitamin E dan vitamin C adalah antioksidan yang memiliki efek saling melindungi. Vitamin E merupakan antioksidan yang mencegah terjadinya peroksidasi lipid, sedangkan vitamin C adalah antioksidan yang larut air. Fungsi yang berbeda pada tempat berbeda tersebut membuat vitamin E dan vitamin C memiliki efek yang lebih baik dibanding apabila vitamin tersebut menjadi antioksidan sendiri-sendiri. ROS dapat mengoksidasi vitamin E membentuk radikal tocopheroksil. Vitamin C dapat mereduksi vitamin E radikal, dengan meregenerasi vitamin E (Ryan *et al.*, 2010).





Gambar 2.12. Efek Antioksidan Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E (Trabe, 2011)

Gambar 2.12 adalah efek antioksidan kombinasi vitamin C dan vitamin E pada peroksidasi lipid (LPO). Radikal bebas dapat terbentuk ketika suatu molekul menyumbangkan satu elektronnya, mengambil satu elektron dari molekul lain, atau bergabung dengan molekul nonradikal lainnya. Akibatnya reaksi ini menghasilkan radikal bebas baru. Reaksi radikal bebas dan nonradikal merupakan gambaran suatu reaksi berantai. Reaksi berantai ini akan terus berlanjut hingga ada antioksidan tubuh (Yuslianti, 2018).

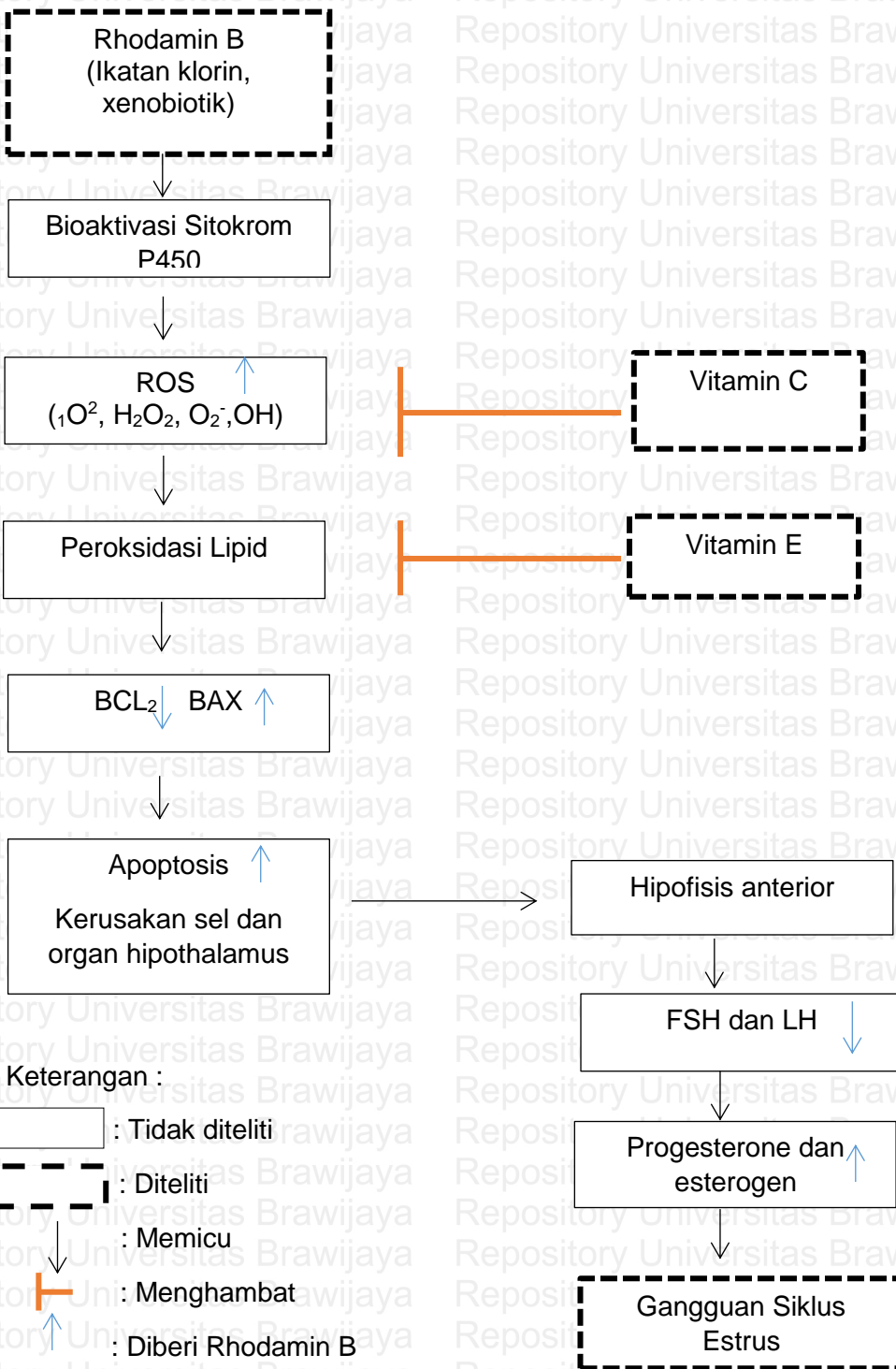
Reaksi LPO (*Lipid Peroxydation*) dapat dipicu oleh ROS ( $R^\cdot$ ) yang dapat mereduksi *polyunsaturated fatty acid* (LH) menjadi L karena kehilangan H, L akan berikatan dengan  $O_2$  membentuk lipid peroksil LOO. LOO dapat mengikat H dari PUFA lain (LH) lain sehingga LH tereduksi menjadi L $^\cdot$ , reaksi ini dapat terjadi terus-menerus. Vitamin C atau ascorbic acid (Asch) dapat berikatan dengan R secara langsung dan mencegah R $^\cdot$  yang dapat memicu lipid peroksil, Asch juga dapat bereaksi dengan mereduksi radical tocopheroxyl (Toc $^\cdot$ ) sehingga dapat diregenerasi menjadi Toch. Ascorbic acid yang telah bereaksi akan membentuk Asc $^\cdot$ . GSH adalah antioksidan endogen yang terdapat dalam tubuh, dapat meregenerasi radical ascorbil (Asc $^\cdot$ ) kembali menjadi Asch (Trabe, 2011).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep







### 3.2 Keterangan Kerangka Konsep

Rhodamin B adalah salah satu zat pewarna yang berbahaya bagi tubuh memiliki ikatan klorin dan merupakan golongan xenobiotik yang dapat meningkatkan ROS. Peningkatan ROS ini dapat memicu stress oksidatif. Apabila stress oksidatif ini berlangsung terus menerus maka dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada mitokondria, dan sapat memicu gangguan mitokondria. Peroksidasi lipid dapat meningkatkan BAX, apabila BCL<sub>2</sub> tidak mampu mereduksi BAX maka yang dapat terjadi adalah apoptosis sel pada region hipotalamus. Otak dilindung oleh blood brain barrier, namun bagian nucleus ventromedial dan nucleus arkuata tempat GnRH mensekresi FSH dan LH tidak terlindungi. Akibatnya dapat terjadi apoptosis yang menyebabkan disfungsi dan kerusakan yang dapat mempengaruhi sekresi FSH dan LH, sehingga FSH dan LH semakin menurun.

FSH dan LH yang semakin menurun akan mengganggu pembentukan folikel di ovarium, sehingga akibatnya adalah folikel tidak dapat berkembang, dan tidak mengalami ovulasi. FSH dan LH memiliki hubungan timbal balik negative dengan hormon esterogen dan progesteron. Apabila FSH dan LH menurun, akan memicu peningkatan esterogen dan progesteron, akibatnya terjadi penebalan sel squamous pada bagian uterus dan vagina yang membuat persisten seperti kondisi estrus, dampaknya adalah siklus estrus semakin panjang.

Secara alamiah, tubuh memiliki kemampuan untuk mengatasi radikal bebas, namun kemampuan tubuh tersebut terbatas, tubuh tidak mampu menetralsir radikal bebas yang terakumulasi terus menerus dan berlebihan sehingga diperlukanlah zat tambahan yaitu antioksidan. Antioksidan yang dapat digunakan adalah vitamin C dan vitamin E yang dapat menghambat ROS dan



dapat memutus rantai reaksi radikal, sehingga dapat menghambat radikal bebas yang terdapat pada hipotalamus maupun ovarium yang mengganggu hormon reproduksi sehingga tidak terjadi gangguan pada siklus estrus.

### **3.2 Hipotesis Penelitian**

3.2.1 Rhodamin B dapat memperpanjang siklus estrus

3.2.2 Vitamin C dapat memperpendek siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B

3.2.3 Vitamin E dapat memperpendek siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B

3.2.3 Kombinasi Vitamin C dan vitamin E dapat memperpendek siklus estrus yang telah diberi rhodamin B





## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan design penelitian *true experimental*.

Penelitian ini dilakukan dengan cara membandingkan antara kelompok yang diberi perlakuan dengan kelompok kontrol tikus wistar dengan *design* pendekatan penelitian *prepost test control group design*. Penelitian eksperimental dilakukan untuk melihat adanya dampak dari intervensi yang telah dilakukan. Dalam penelitian ini intervensi peneliti adalah pemberian Rhodamin B dilanjut dengan pemberian vitamin C dan vitamin E terhadap hewan coba tikus putih betina. Sedangkan hal yang terjadi adalah akibat dari intervensi yaitu lama siklus estrus.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

##### 4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah hewan coba yang digunakan, yaitu tikus (*Rattus norvegicus strain wistar*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Besar sampel dalam penelitian ini disebut replikasi merupakan banyaknya sampel yang digunakan selama penelitian. Replikasi adalah banyaknya unit eksperimen yang mendapat perlakuan sama. Penelitian ini tikus akan dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Dua kelompok merupakan kelompok kontrol dan 3 lainnya adalah kelompok perlakuan. Jumlah sampel dari tiap kelompok dengan rumus Frederer (1963) sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

r : banyak perlakuan



$n$  : banyak ulangan

$$(n-1)(r-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4 = 4,75 = 5$$

Bedasarkan perhitungan besar sampel menurut Federer diperoleh sampel per kelompok adalah 5 ekor. Namun untuk menghindari *drop out* pada sampel ditambahkan 10% dan penambahan 10% dihasilkan jumlah sampel 5,5 yang dibulatkan menjadi 6 ekor. Jadi jumlah sampel pada penelitian ini adalah 5 ekor untuk setiap kelompok perlakuan.

#### 4.2.2 Kriteria Sampel

Sampel pada penelitian ini diambil secara acak, dengan kriteria sebagai berikut:

1. Jenis kelamin betina
2. Umur 2-3 bulan, usia 2-3 bulan ini dikarenakan sistem reproduksi tikus mengalami dewasa kelamin pada usia 50+10 hari atau 60 hari
3. Sehat (gerak aktif, berbulu putih)

Kriteria dropout untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tikus selama penelitian tidak mau makan
2. Tikus yang memiliki siklus estrus tidak normal





#### 4.2.3 Pembagian Kelompok

Tikus yang telah sesuai dengan kriteria maka akan dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok control, yang masing-masing terdiri dari 5 tikus. Pembagian kelompok tikus dilakukan secara acak. Pembagian kelompok tikus tersebut adalah:

1. Kelompok kontrol (-) : kelompok tikus yang tanpa perlakuan (tidak dipapar Rhodamin B, Vitamin C, dan Vitamin E) diberikan pelarut minyak wijen 1 ml dan aquabides 1 ml
2. Kelompok kontrol (+): kelompok kontrol yang dipapar Rhodamin B dengan dosis 90 mg/KgBB/hari + pelarut minyak wijen 1 ml + pelarut aquabides 1 ml, tanpa pemberian vitamin C dan Vitamin E
3. Kelompok perlakuan 1: kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 90mg/KgBB/hari + vitamin C 600 mg/KgBB/hari + pelarut aquabides 1 ml + pelarut minyak wijen 1 ml
4. Kelompok perlakuan 2: kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 90mg/KgBB/hari + vitamin E dosis 40 IU Kg/BB/hari + pelarut aquabides 1 ml + pelarut minyak wijen 1 ml
5. Kelompok perlakuan 3: kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 90mg/KgBB/hari + vitamin C 150mg/KgBB/hari + vitamin E dosis 40 IU Kg/BB/hari + pelarut aquabides 1 ml + pelarut minyak wijen 1 ml

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati atau diukur meliputi:

- a. Variabel Independen : pemberian rhodamin B, vitamin C, dan vitamin E
- b. Variabel dependen : lama siklus estrus

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Rencana penelitian akan dilaksanakan selama tiga bulan, dari bulan Desember 2018 sampai dengan Maret 2019.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan Penelitian

##### 1. Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Makanan untuk hewan coba adalah makanan ternak, sedangkan minumannya adalah air. Kebutuhan makan tikus dewasa per ekor untuk diet normal adalah 40 g/ hari.

##### 2. Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

- 1) Rhodamin B *Sigma Aldrich* C.I 45170
- 2) Vitamin C dengan nama dagang C-IPI
- 3) Vitamin E dengan nama dagang Nature-E 100 IU
- 4) Minyak wijen
- 5) Aquabides
- 6) Giemsa 3%
- 7) NaCl Fisiologis 0,9%
- 8) *Cotton bud*

##### 4.5.2 Alat Penelitian

##### 1. Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- 1) Kandang hewan coba yang berbentuk *box* plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm. Tutup kandang tikus dari kawat berukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm





2) Kandang sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas dan ditutup dengan kawat berjaring. Masing-masing kandang diisi 5 tikus.

3) Tempat minum

## 2. Alat Pemberian Rhodamin B

1) Timbangan analitik

2) Botol dengan penutup

3) Gelas ukur

4) Pengaduk

5) Spuit 1 ml

6) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)

## 3. Alat untuk Pemberian Vitamin E pada Hewan Coba

1) Botol dengan penutup

2) Gelas ukur

3) Pengaduk

4) Spuit 1 ml

5) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)

## 4. Alat untuk Pemberian Vitamin C pada Hewan Coba

1) Botol dengan penutup

2) Spuit 1 ml

3) Spuit yang ujungnya dipasang platina (sonde)

## 5. Alat untuk Melihat Lama Siklus Estrus

1) Mikroskop cahaya

2) Kaca objek

3) Kaca penutup

## 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Keterangan	Satuan
<b>Rhodamin B</b>	Rhodamin B <i>Sigma Aldrich</i> C.I 45170 dengan dosis 90 mg/KgBB/hari peronde, diberikan oleh petugas laboratorium selama 36 hari setiap jam 10.00 di laboratorium farmakologi FKUB (Sulistiana, 2014)	mg/KgBB/hari
<b>Vitamin E satu dosis</b>	Vitamin E (Natur E 100 IU) dengan dosis 40 IU/KgBB/hari peronde, diberikan setelah 4 jam pemberian rhodamin B oleh petugas laboratorium selama 36 hari di laboratorium farmakologi FKUB (Laili, 2015)	mg/KgBB/hari
<b>Vitamin C satu dosis</b>	Vitamin C (C-IPI) dengan dosis 600 mg/KgBB/hari peronde, diberikan setelah 4 jam pemberian rhodamin B oleh petugas laboratorium selama 36 hari di laboratorium farmakologi FKUB (Laili, 2015)	mg/KgBB/hari
<b>Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E</b>	Vitamin E (Nature E) dengan dosis 40 IU/KgBB/hari dan vitamin C (C-IPI) dengan dosis 600 mg/KgBB/hari peronde, diberikan setelah 4 jam pemberian rhodamin B oleh petugas laboratorium selama 36 hari di laboratorium farmakologi FKUB	mg/KgBB/hari
<b>Siklus Estrus</b>	Lama siklus estrus dihitung dari hari pertama fase estrus/proestrus hingga bertemu hari fase estrus/proestrus kembali karena pada fase tersebut memiliki jangka waktu yang sesuai tidak terlalu panjang atau terlalu singkat. Peneliti membedakan setiap fase siklus estrus dengan melakukan swab vagina lalu diamati karakteristik sel pada tiap fase yang terdapat pada gambar 2.1, 2.2, 2.3, dan 2.4 menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan 1x sehari, dilakukan sebelum perlakuan selama 2x siklus dan pada hari ke 15 perlakuan selama 3x siklus. Pengambilan swab vagina dan pengamatan karakteristik sel dilakukan oleh peneliti di laboratorium farmakologi FKUB (Febrina, 2013; Bryen <i>et al</i> , 2012).	Hari



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Cara Kerja

#### 1. Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus putih diadaptasikan 1 minggu dalam kandang untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan diberikan makan standar. Setelah diadaptasikan tikus akan dibagi menjadi 5 kelompok oleh petugas laboratorium.

#### 2. Pembagian kelompok

Tikus sebagai hewan coba dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, pembagian tikus dilakukan secara acak sesuai dengan kelompok inklusi dan eksklusi oleh petugas laboratorium

#### 3. Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5 cm-1 cm dan diganti setiap 3 hari sekali. Cahaya diruangan datur persis jam 12, jam terang (06.00-19.00) dan 12 jam gelap pukul, kelembapan dan temperatur dibiarkan pada kisaran alamiah.

Tikus diadaptasikan dalam lingkungan penelitian baru, diberi makanan standart (Lab farmako FKUB), dan minum secara ad libitum oleh petugas laboratorium.

#### 4. Identifikasi fase estrus hewan coba

Sebelum dilakukan perlakuan, maka perlu dilakukan pemeriksaan siklus estrus setiap tikus untuk mengetahui apakah tikus memiliki siklus yang normal 4-5 hari selama 2x siklus. Identifikasi dilakukan oleh peneliti dengan cara pengambilan sel apusan vagina setiap 1x/hari setiap pukul 07.00-08.00. Pembuatan preparat apusan vagina dilakukan dengan cara mengambil cairan vagina pada lokasi kira-kira 1-2 cm dari vulva menggunakan *cotton bud* yang dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9%. Hasil usapan dioleskan pada gelas objek dan preparat difiksasi dengan alkohol 70% dibiarkan sampai kering, diwarnai dengan giemsa 3% dan



dibiarkan selama dua menit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40x.

#### 5. Prosedur Pemberian Rhodamin B pada Hewan Coba

Rhodamin B dilarutkan dalam 1 ml aquabides diberikan secara peroral dengan dosis 90mg/ KgBB/hari dengan spuit yang ujungnya terbuat dari platina. Rhodamin

B *Sigma Aldrich* C.I 45170 diberikan 1x/hari pada pukul 10.00 oleh petugas laboratorium.

#### 6. Pemberian Vitamin C

Vitamin C yang digunakan adalah merk C-IPI dengan dosis 600 mg/KgBB/hari dilarutkan dengan aquabides 1 ml setelah 4 jam pemberian rhodamin B yaitu pukul 14.00 oleh petugas laboratorium.

#### 7. Pemberian Vitamin E

Vitamin E yang digunakan adalah Nature-E 100 IU dengan dosis 40 IU/KgBB/hari diberikan perorale setelah 4 jam pemberian rhodamin B yaitu pukul 14.00 oleh petugas laboratorium.

#### 8. Prosedur Pengambilan Apusan Vagina dan Pengamatan

Setelah diberikan perlakuan maka dilakukan pengamatan apusan sel vagina oleh peneliti selama 3 kali siklus pada hari ke 15 setelah diberi perlakuan. Parameter yang diamati adalah bentuk sel epitel setiap fase. Pengambilan sampel sitologi dilakukan 1 kali sehari pada pukul 07.00-08.00. Pembuatan preparat apusan vagina dilakukan dengan cara mengambil cairan vagina pada lokasi kira-kira 1-2 cm dari vulva menggunakan *cotton bud* yang dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9%.

Hasil usapan dioleskan pada gelas objek dan preparat difiksasi dengan alkohol 70% dibiarkan sampai kering, diwarnai dengan giemsa 3% dan dibiarkan selama







dua menit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40x.

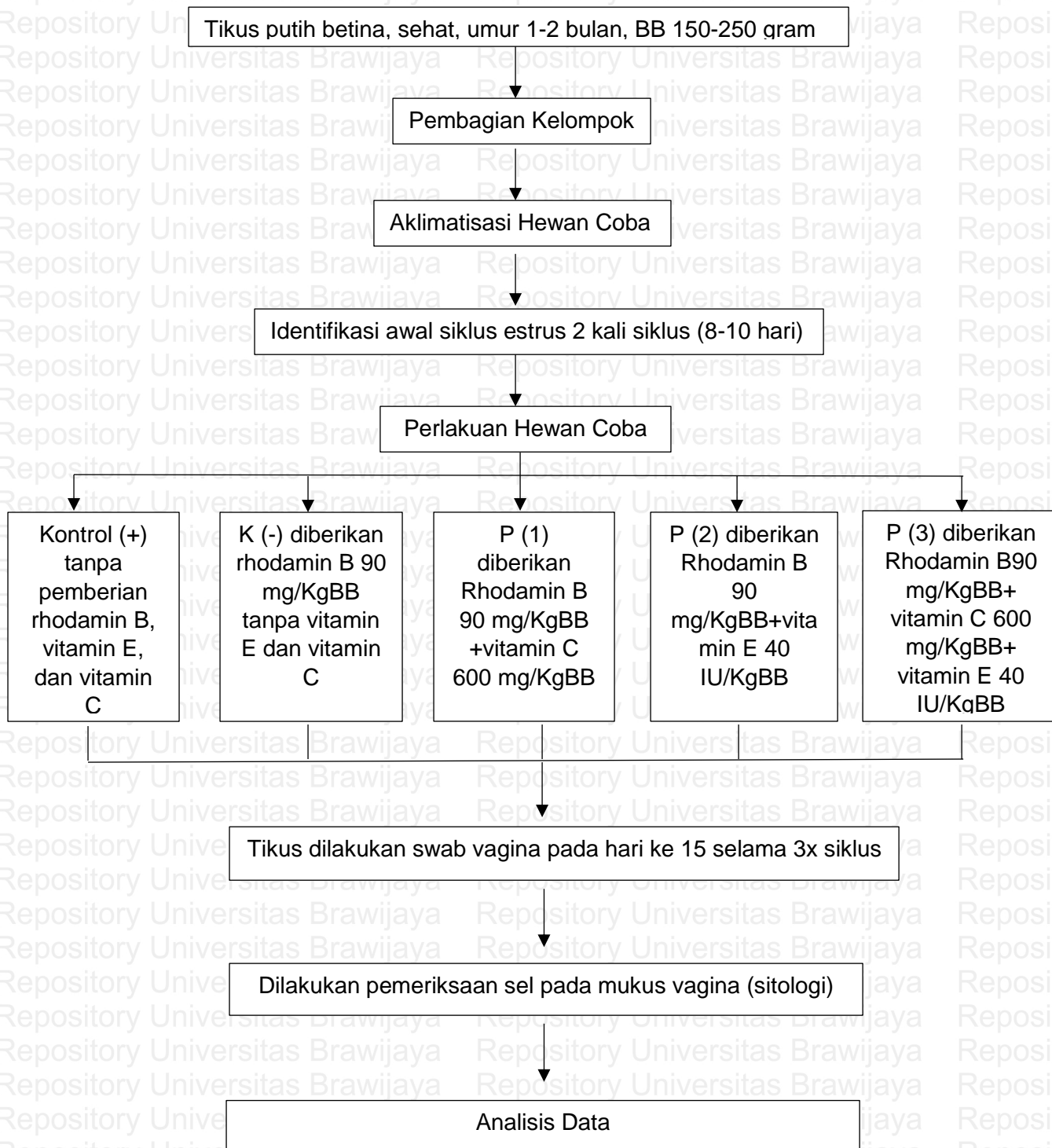
#### 4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan program SPSS 20.0 dengan tingkat signifikansi 0.05 ( $p < 0.05$ ). Langkah-langkah pengujian data adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data: bertujuan untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jika terdistribusi normal, maka menggunakan uji parametric.
2. Uji homogenitas varian: jika varian dalam kelompok homogen, maka asumsi untuk menggunakan Anova pada uji parametric terpenuhi.
3. Uji One Way Anova (parametrik) bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan
4. Uji post Hoc (parametrik) untuk mengetahui perbandingan rerataan secara berpasangan

#### 4.8 Alur Penelitian

##### Bagan Kerangka Operasional Penelitian







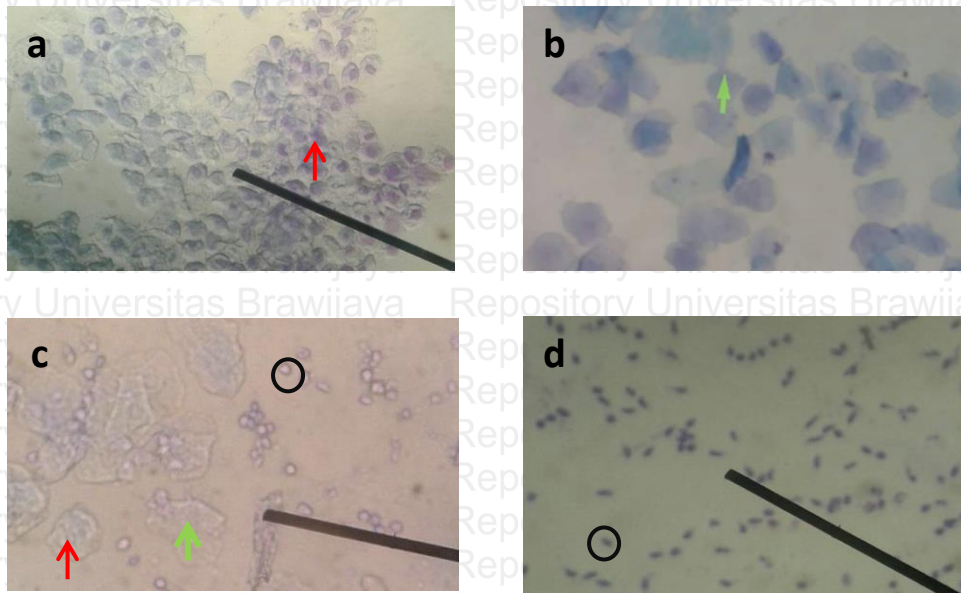
## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Karakteristik Hewan Percobaan

Tikus putih betina jenis *Rattus norvegicus* galur wistar diperoleh dari laboratorium farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tikus berjumlah 25 ekor berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram, memiliki siklus yang normal dan teratur. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok yang dibagi secara random yaitu kelompok K (-) merupakan kelompok yang tidak diberi perlakuan, K(+) kelompok yang diberi rhodamin B, P(1) kelompok yang diberi rhodamin B dan vitamin C, P (2) kelompok yang diberi rhodamin B dan vitamin E, dan P (3) kelompok yang diberi rhodamin B, vitamin C, dan vitamin E.

Perlakuan dilakukan selama 36 hari, sebelum diberi perlakuan dilakukan pretest swab vagina selama 2x siklus (8-10 hari) untuk mengetahui tikus memiliki siklus yang normal, teratur atau tidak teratur. Swab vagina juga dilakukan setelah hari ke 15 perlakuan, dilakukan selama 3x siklus. Setiap fase memiliki karakteristik sel yang berbeda-beda. Fase proestrus ditandai dengan dominansi jumlah sel epitel berinti, fase estrus ditandai dengan adanya sel epitel terkornifikasi, fase metestrus ditandai dengan adanya sel epitel berinti, leukosit dan sel epitel terkornifikasi, fase diestrus ditandai dengan adanya leukosit yang dominan. Untuk menghitung lama siklus estrus dihitung dari fase estrus/proestrus hari pertama hingga bertemu kembali dengan fase estrus/proestrus dengan mengamati karakteristik hasil apusan swab vagina setiap hari pada 2x siklus sebelum diberi perlakuan dan setelah hari ke 15 hingga 3x siklus, kemudian dihitung rata-ratanya.



Gambar 5.1 Siklus Estrus Tikus. (a) Fase Proestrus, (b) Fase Estrus, (c) Fase Metestrus, (d) Fase Diestrus. Panah merah ( ) menunjukkan sel epitel berinti. Panah hijau ( ) menunjukkan sel epitel terkornifikasi, dan lingkaran(O) menunjukkan leukosit.

Tabel 5.1 Rerata Lama Siklus pretest (2x siklus), posttest (3x siklus), dan delta setelah diberi Rhodamin B, Vitamin C, dan Vitamin E

Kelompok	Rerata lama siklus (Hari)		Delta	$\bar{x} \pm SD$
	Pretest	Posttest		
Kontrol (-)	4	4,3	0,3	0,06±0,13
	5	5	0	
	4	4	0	
	4	4	0	
	4	5	1	
	4	4,3	0,3	
Kontrol (+)	4	4,6	0,6	0,5±0,31
	5	5,3	0,3	
	4	4,3	0,3	
	4	4,6	0,6	
Perlakuan I	5	5	0	0,12±0,27
	5	5	0	
	4	4	0	





	4	4	0	
	5	5,3	0,3	
	5	5,3	0,3	
Perlakuan II	4	4,3	0,3	0,3±0,0
	4	4,3	0,3	
	4	4,3	0,3	
	4	4,6	0,6	
	4	4	0	
Perlakuan III	4	4	0	0,12±0,27
	4	4	0	
	5	5	0	

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak, selain itu uji normalitas juga dilakukan sebagai prasyarat uji parametric. Uji normalitas yang digunakan adalah uji dengan saphiro-wilk karena sampel kurang dari 50.

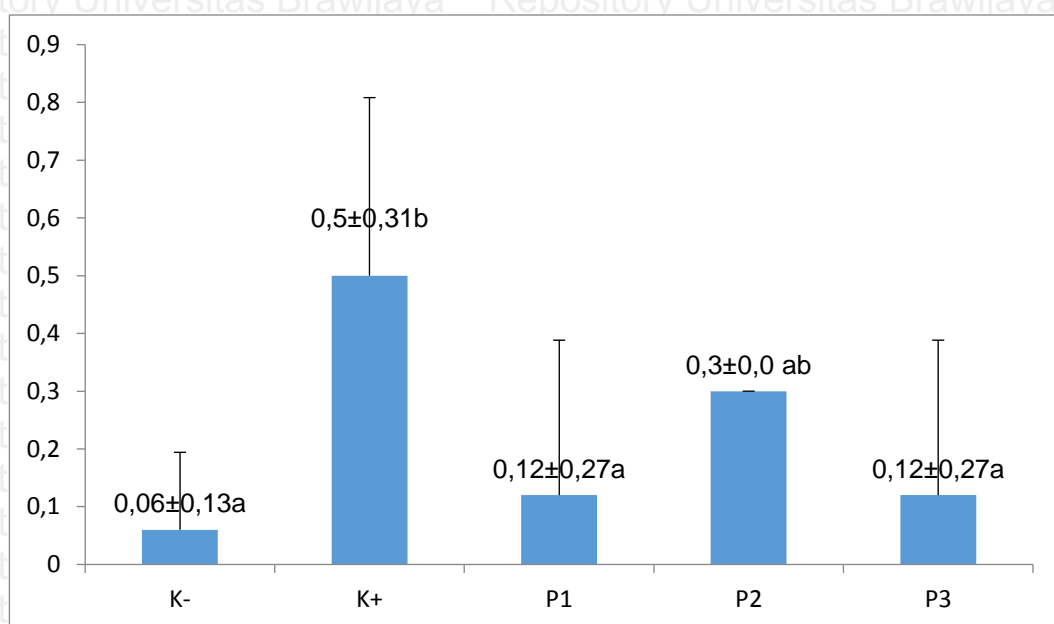
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Lama Siklus Estrus	Jumlah sampel	Normalitas Saphiro Wilk		Homogenitas Lavene	
		P	Distribusi	p	Homogenitas
	25	0.716	Normal	0.052	Homogen

Bedasarkan tabel 5.3 Uji normalitas tersebut menunjukkan  $p$  adalah 0.176 dimana  $p > 0.05$  sehingga data tersebut menunjukkan distribusi normal. Hasil menunjukkan bahwa data homogen dengan  $P$  0.052 dimana  $P > 0.05$  yang merupakan persyaratan untuk dilakukan uji one way anova.

### 5.2.2 Hasil Analisis Perbandingan Siklus Estrus antar Kelompok Perlakuan

Untuk mengukur perbandingan lama siklus kelompok perlakuan dapat berbeda secara signifikan atau tidak, digunakan uji one way annova dimana didapatkan hasil  $p=0.036$ . Hal ini menunjukkan terdapat adanya perbedaan yang signifikan. Setelah dilakukan uji one way anova dilakukan uji post hoc LSD untuk mengetahui perbedaan diantara kelompok perlakuan tersebut.



Gambar 5.2 Grafik Rerata Delta Lama Siklus Estrus Tiap Kelompok Perlakuan dan Beda Antar Kelompok Perlakuan (Rerata ± SD jika memuat huruf yang sama maka tidak ada perbedaan yang bermakna  $p > 0,05$  dan apabila memuat huruf yang berbeda maka ada perbedaan yang bermakna  $p < 0,05$ ). K- adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan. K+ adalah kelompok yang hanya diberi rhodamin B, P1 adalah kelompok yang diberi rhodamin B yang diberi vitamin C. P2 adalah kelompok rhodamin B yang diberi vitamin E. P3 adalah kelompok rhodamin B yang diberi kombinasi vitamin C dan vitamin E.

Hasil analisis menggunakan post hoc LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara K+ dengan K-, hal ini berarti rhodamin B dapat memperpanjang siklus estrus. P1 berbeda secara bermakna terhadap K+, hal ini berarti vitamin C dapat memperpendek lama siklus estrus yang telah diberi rhodamin B. P2 tidak berbeda secara bermakna terhadap K+. hal ini berarti vitamin





E tidak mampu memperpendek lama siklus estrus yang telah diberi rhodamin B.

P3 berbeda secara bermakna terhap K+ hal ini berarti kombinasi vitamin C dan vitamin E dapat memperpendek lama siklus estrus yang telah diberi rhodamin B.



## BAB 6

### Pembahasan

#### 6.1 Pemberian Rhodamin B Memperpanjang Siklus Estrus

Bedasarkan hasil uji post hoc gambar 5.2, menunjukkan perbedaan yang bermakna rerata delta lama siklus estrus kelompok kontrol negatif yaitu tikus sehat dengan kelompok kontrol positif yaitu kelompok yang telah diberi rhodamin B. Hal ini membuktikan bahwa kelompok tikus yang diberi rhodamin B memiliki siklus yang lebih panjang apabila dibandingkan dengan kelompok tikus yang sehat.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Febriana dkk (2013), dimana pemberian rhodamin B dengan dosis 150 ppm, 300 ppm, dan 450 ppm, dapat memperpanjang siklus estrus tikus. Salah satu tanda kesuburan pada wanita adalah siklus reproduksi yang teratur. Siklus menstruasi yang teratur, menandakan adanya maturasi oosit dan pengeluaran hormon yang teratur (Woldemeskel, 2017). Siklus estrus merupakan siklus reproduksi pada tikus *rattus norvegicus*, siklus ini menggambarkan siklus menstruasi pada wanita. Siklus estrus normalnya berlangsung selama 4-5 hari, memiliki 4 fase dimana setiap fase memiliki karakteristik yang berbeda dan dipengaruhi oleh perubahan hormon yang berubah secara fisiologis. Fase dalam siklus estrus menurut *Life Science Weekly* (2013) adalah pertama fase proestrus ditandai dengan peningkatan FSH dan estradiol yang dapat memicu pertumbuhan folikel de graff. Namun, pada fase ini terjadi penurunan progesteron akibat regresi korpus luteum. Kedua adalah fase estrus dimana pada fase ini terjadi peningkatan LH yang dapat memicu ovulasi. Ketiga adalah fase mesestrus, setelah ovulasi, dimana folikel de graff berkembang



menjadi korpus luteum dan menghasilkan progesteron. Fase terakhir adalah fase diestrus dimana estradiol rendah.

Rhodamin B merupakan salah satu zat xenobiotik yang dapat meningkatkan ROS berupa hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) dan singlet oksigen  $^1\text{O}_2$  (Mohamed, 2018; Yuslianti, 2018). Selain itu, xenobiotik dapat mengaktivasi sitokrom P450 memproduksi ROS yaitu hidroksil peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dan anion superoksida ( $\text{O}_2^-$ ) (Rezende et al, 2017; Zangar et al, 2004). Rhodamin B dapat memicu kondisi stress oksidatif atau kondisi dimana antioksidan dan ROS tidak seimbang. Kondisi ini dapat menyebabkan kerusakan seluler dan molekuler, mengganggu produksi ATP mitokondria dan dapat juga menyebabkan kerusakan DNA, protein, dan lipid pada sel, akibatnya dapat mengganggu kinerja sel pada ovarium sehingga dapat mempengaruhi kinerja hormon dan mengganggu siklus estrus (Agarwal, 2012; Maqbool dkk, 2015; Roth, 2018). Rhodamin B dapat meningkatkan apoptosis sel pada hipotalamus. Apoptosis dapat dipicu oleh sinyal eksoogen dan endogen. Kematian sel disebabkan oleh protein proapoptosis. ketidakseimbangan BAX dan BCL<sub>2</sub> dapat memicu lepasnya sitokrom C dari mitokondria. Sitokrom C dapat berikatan dengan Apaf 1 yang dapat mengaktivasi caspase 9 membentuk apoptosome, dan dapat memicu caspase 7, dan 3 yang dapat memicu apoptosis sel pada nucleus arkuata dan nucleus ventromedial hipotalamus, dimana secara anatomis pada bagian ini juga tidak dilindungi oleh blood brain barrier dapat menyebabkan kerusakan dan disfungsi sel, akibatnya mempengaruhi hipofisis anterior dalam pengeluaran FSH dan LH pada tikus yang diberi rhodamin B (Mohajeri, 2018; Sulistina, 2014).

Menurut Putriningtyas (2017) dalam struktur rhodamin B memiliki ikatan klorin (Cl) yang merupakan senyawa halogen yang mudah bereaksi, dan memiliki



reaktivitas yang tinggi. Klorin dapat mengaktivasi sitokrom P450 meningkatkan produksi  $H_2O_2$ , selain itu klorin dapat memicu apoptosis pada sel (Twaroski, 2001; Vissers, 2001). Rhodamin B memiliki ikatan klorin yang dapat menjadi reproduksi toksikan. Kondisi ini dapat mengganggu pengeluaran estrogen, dimana estrogen memiliki hubungan timbal balik antara gonad dan otak, dan dapat mengganggu ovulasi dengan mengganggu hubungan timbal balik LH-estrogen, menunda ovulasi, dan mengganggu kesuburan (Woldemesker, 2017).

Xenobiotik memberikan respon morfologi yang berbeda-beda terhadap sistem reproduksi, Dalam penelitian ini respon morfologi yang terjadi adalah folikel pada ovarium semakin sedikit dan terjadi peningkatan jumlah proliferasi sel pada serviks, hal ini dapat terjadi karena FSH dan LH menurun meningkatkan sintesis hormon reproduksi yaitu estrogen. Penurunan hormon FSH dan LH memicu atrofi ovarium karena terjadi penurunan jumlah folikel, dan kondisi ini dapat memicu folikular cysts dimana folikel pada ovarium gagal untuk ovulasi. Namun, kondisi ini dapat memicu peningkatan sirkulasi hormon estrogen, progesterone, atau kombinasi keduanya yang dapat mengakibatkan hiperplasia dan hipertropi pada uterus dan vagina, dominansi estrogen tersebut diikuti hiperplasia sel squamous vagina sehingga menyebabkan kondisi seperti estrus. (Agarwal, 2012).

## **6.2 Pengaruh Pemberian Vitamin C, Vitamin E, Kombinasi Vitamin C dan E terhadap Siklus Estrus Tikus yang Diberi Rhodamin B**

Siklus estrus pada kelompok P1 yaitu kelompok tikus rhodamin B yang diberi vitamin C secara signifikan memiliki siklus estrus yang lebih singkat apabila dibandingkan dengan siklus estrus pada kelompok K+ yaitu kelompok tikus yang diberi rhodamin B saja. Vitamin C (*ascorbic acid*) adalah antioksidan utama yang







larut dalam air, plasma, dan jaringan, efektif dapat menurunkan kejadian kerusakan oksidatif pada sel, yang dapat memicu disfungsi organ dengan cara mereduksi radikal bebas seperti singlet oksigen  $^1O_2$ , anion superoksida  $O_2^-$ , hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan peroxynitrite serta dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid (Singh, 2017; Combs, 2017; Straaten, 2004). Vitamin C memiliki 1 molekul askorbat anion ( $AsC^-$ ) yang merupakan donor antioksidan utama vitamin yang bereaksi dengan radikal bebas, vitamin C yang telah mendonorkan atomnya akan menghasilkan vitamin C radikal ( $Asc^{2-}$ ) yang memiliki reaktivitas yang rendah namun dapat direduksi menjadi vitamin C kembali oleh GSH (Lawson dkk, 2017). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa vitamin C dapat meningkatkan kadar progesterone pada wanita infertil, menurunkan kadar MDA pada testis, meningkatkan FSH dan LH, vitamin C juga mampu mencegah apoptosis sel yang diakibatkan oleh klorin oksidan (Mahdi, 2019; Chambial, 2013; Vissers, 2001).

Siklus estrus tikus P2 yaitu kelompok tikus rhodamin B yang diberi vitamin E memiliki siklus estrus yang lebih singkat apabila dibandingkan dengan kelompok K+ yaitu kelompok yang diberi rhodamin B namun perbedaan ini tidak berbeda secara bermakna. Vitamin E adalah vitamin yang larut lemak, bekerja dalam membran sel, dan dapat mereduksi  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , dan OH dengan memutus rantai ikatan radikal selama proses peroksidasi lipid (Combs 2012; Agarwal, 2012; Tahan dkk, 2010). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa vitamin E kurang efektif dalam menurunkan hiperglikemia pada reproduksi pria, apabila dibanding dengan vitamin C, maupun kombinasi antara vitamin C dan vitamin E, vitamin C lebih protektif dibanding vitamin E (Mahdi, 2019; Fernandes, 2011).

Bedasarkan hasil uji post hoc pada gambar 5.2 terjadi perbedaan yang bermakna antara P3 kelompok tikus rhodamin B yang diberi kombinasi vitamin C dan Vitamin E dibandingkan dengan kelompok K+, namun apabila dilihat dari grafik yang ada, hasil P2 menunjukkan nilai yang sama dengan P1 yaitu kelompok tikus rhodamin B yang diberi vitamin C. Vitamin C dapat mereduksi radikal bebas secara langsung serta dapat meregenerasi  $\alpha$ -tocopherol radikal menjadi  $\alpha$ -tocopherol kembali apabila mendonasikan hidrogennya (Trabe, 2011). Kombinasi vitamin C dan vitamin E dapat bekerjasama dengan baik untuk mengatasi efek dari radikal bebas dengan target organ yang berbeda. Penelitian menunjukkan bahwa kombinasi vitamin E dan vitamin C mampu merunkan kadar MDA pada tikus yang telah diberi rhodamin B (Laili, 2015).

### 6.3 Keterbatasan Penelitian

Swab vagina yang dilakukan untuk melihat siklus estrus hanya dilakukan sekali, sehingga lama setiap fase dalam siklus tidak dapat digambarkan dengan pasti. Gangguan siklus estrus dapat disebabkan oleh radikal bebas yang dapat mengganggu pengeluaran hormon esterogen, progesterone, FSH, dan LH yang dapat disebabkan oleh gangguan kualitas, fungsi folikel ovarium, dan fungsi hipotalamus. Untuk melengkapi hasil penelitian ini, diperlukan studi lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E terhadap hormon esterogen, progesterone, FSH, dan LH yang dapat disebabkan oleh gangguan kualitas, fungsi folikel ovarium, dan fungsi hipotalamus yang telah diberi rhodamin B.





## BAB 7

### Penutup

#### 7.1 KESIMPULAN

1. Rhodamin B dapat memperpanjang lama siklus estrus
2. Vitamin C dapat memperpendek siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B
3. Vitamin E tidak dapat memperpendek siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B
4. Kombinasi vitamin C dan Vitamin E dapat memperpendek siklus estrus tikus yang telah diberi rhodamin B

#### 7.2 Saran

1. Bagi masyarakat, rhodamin B merupakan zat yang berbahaya dan perlu dihindari, karena dapat mengganggu siklus menstruasi. Apabila tidak dapat menghindari, diperlukan tambahan bahan makanan yang mengandung vitamin C dan E.
2. Bagi tenaga kesehatan terutama bidan, sebaiknya memberikan penyuluhan kepada ibu-ibu dan remaja putri mengenai rhodamin B dan dampaknya terhadap siklus menstruasi yang merupakan salah satu indikasi kesuburan pada wanita, serta manfaat vitamin C dan vitamin E dalam menangkal radikal bebas yang dapat dihasilkan oleh rhodamin.
3. Bagi peneliti berikutnya dapat dipertimbangkan untuk meneliti pengaruh pemberian vitamin C dan vitamin E terhadap hormon esterogen, progesterone, FSH, dan LH yang dapat disebabkan oleh gangguan kualitas, fungsi folikel ovarium, dan fungsi hipotalamus yang telah diberi rhodamin B.

## DAFTAR PUSTAKA

- Astuti A., Muchtadi, D., Astawan M., Purwantara B., Wresdiyati T. 2009. *Pengaruh Pemberian Tepung Kedelai terhadap Kadar Malonaldehid (MDA), Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Testis dan Profil Cu, Zn-SOD Tubuli Seminiferi Testis Tikus Jantan*. J. Teknol. dan Industri Pangan 2 (20)
- Agarwal, A., Mellado A., Premkumar B., Shaman A., Gupta S. 2012. *The Effects of Oxidative Stress on Female Reproduction: a Review*. Reproductive Biology and Endocrinology (10) 49 DOI:10.1186/1477-7827-10-49
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci, O. 2012. *Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. WAO Journal (5) 9-19.
- Byers, S., Wiles, M., Dunn L. S., Taft, R. 2012. *Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images*. Plos One vol 7 (4)
- BPOM RI. 2011. Rhodamin B
- Chambial S., Dwivedi S., Shukla K., John P., Sharma. 2013. *Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview*. Clinical Biochemists 28 (4): 314-328
- Chatterjee, A., Chatterji, U. 2010. *Arsenic Abrogates the Estrogen Signaling Pathway in Uterus*. Reproductive Biology and Endocrinology 8:80
- Christyaningsih, J. Notopuro H., Darmanto, W., Mutiarawati, D.T. 2010. *Pengaruh Asam Askorbat terhadap Kadar Timbal fetus dan Aktivitas Enzim Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) pada Induk Mencit Terintoksikasi Timbal*. Berk Penel Hayati 16 (27-31)
- Cicek, N., Eryilmaz, O.G., Sarikaya, E. et al. 2012. *Vitamin E Effect on Controlled Ovarian Stimulation of Unexplained Infertile Women*. J Assist Reprod Genet. 29: 325. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9714-1>
- Combs, G. F., and McClung, J. P. (2017a). Vitamin C. In *The Vitamins* (pp. 267–295). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802965-7.00010-1>
- Combs, G. F., and McClung, J. P. (2017b). Vitamin E. *The Vitamins*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802965-7.00008-3>
- Dutordoir, M.R. Bates , D.A. 2016. *Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species*. Biochimica et Biophysica Acta 1863 (2977-2992)
- Faqi, AS. 2017. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development 2<sup>nd</sup> ed*. USA: Elsevier
- Febrina, G. R., Wiratmini, N. I., & Sudatri, N. W. (2013). *Pengaruh Pemberian Rhodamin B terhadap Siklus Estrus Mencit (Mus Musculus L.) Betina*. Jurnal Biologi Udayana, 17(1).
- Fernandes, G., Geradin D., Assumpcao T., et al. 2011. *Can Vitaamins C and E Restore the Androgen Level and Hypersensitivity of the Vas Deferens in*





*Hyperglycemic Rats*. Pharmacological Reports (63) 983-991 ISSN 1734-1140

Gulati, K., Rai N., Ray, A. 2017. *Effect of Stress on Reproductive*. Reproductive and Development Toxicology Doi. 10.1016/B978-0-12-804239-7.00056-1

Hadi, S. 2011. *Apoptosis pada Sel Sperma sebagai Pertanda Adanya Gangguan Kesuburan Pria*. Majalah Kesehatan PharmaMedika 3 (2): 282-285

Halliwell, B., Gutteridge, J. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. UK: Oxford University Press

Hood, R.D. 2016. *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach 3<sup>rd</sup> ed*. USA: CRC Press

Honigberg. 1990. *Trichomonads Parasitic in Humans*. Springer: New York

Laili A.N., Ananingsih, I., Wiyasa, IWA., dkk. 2015. *Protective Effect of Combined Vitamin C and E against Ovarian and Endometrial Toxicity in Rats that Receiving Oral Rhodamine B*. Biomarkers and Genomic Medicine. 7 154-158

Life Science Weekly. 2013. Patents; researchers submit patent application, "*Estrous Cycle Monitoring by Color Response*", for approval.. Retrieved from <https://e-resources.perpusnas.go.id:2057/docview/1435977655?accountid=25704>

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). *Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health*. Pharmacognosy Reviews, 4(8), 118–126. <http://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Hasan, S., Bilal, N., Naqvi S., et al. 2010. *Multivitamin-Mineral and Vitamins (E+C) Supplementation Modulate Chronis Unpredictable Stress-Induced Oxidative Damage in Brain and Heart of Mice*. Biol Trace Elem Res 142:589-597

Indah F.T.M. 2012. *Kejadian Pruritus Vulvae Saat Menstruasi pada Remaja Puteri*. FKM UNAIR

Kemenkes. 1985. Permenkes RI Nomor 239/Men.kes/Per/V/85 tentang zat warna tertentu yang dinyatakan sebagai bahan berbahaya.

Kohen, R., Nyska, A. 2002. *Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*. Toxicologic Pathology 30(6) pp 620-650 doi. 10.1080/01926230290166724

Mahdi, H., tahereh H., Esmail, S., Massood, E. 2019. *Vitamins E and C Prevent Apoptosis of Testicular and Ovarian Tissues Following Mancozeb Exposure in the First-Generation Mouse Pups*. Toxicologix and Industrial Health DOI 10.1177/0748233718818692

Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H., Abdolahi, M. 2015. *Review of Endocrine Disorders Associated with Enviromental Toxicants and Possible Involved Mechanisms*. Life Sciences. Doi. 10.1016/j.lfs.2015.10.022



- Merouani, S., Hamdaoui, O., Saoudi F., Chiha M. 2010. *Sonochemical degradation of Rhodamine B in Aqueous Phase: Effects of Additives*. Chemical Engineering Journal 158 hal 550-557
- Milanti, I. Sulistiawati, Fransiska N., Nugroho H. 2017. *Gambaran Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Siklus Menstruasi pada Mahasiswi Fakultas kedokteran Universitas Mulawarman*. Jurnal Kebidanan Mutiara Mahakam vol 5 (1)
- Mohamed, MA., Nair A., Sandhya. 2018. *Role of Reactive Species in the Visible Light Photocatalytic Mineralization of Rhodamin B Dye by P25- Carbon dot Photocatalyst*. Dyes and Pigments doi. 10.1016/j.dyepig.2018.11.057
- Mohajeri, M., Jimenez, M. C., Barreto, G., Sahebkar, A. 2018. *Effects of Estrogens and Androgens on Mitochondria Under Normal and Pathological Conditions*. Progress in Neurobiology doi 10.1016/j.pneurobio.2019.03.001
- Naish, J., Court D.S. 2015. *Medical Science*. UK: Elsevier
- Oliveira, R., Geraldo, D., Bento F. 2014. *Radical Scavenging Activity of Antioxidants Evaluated by Means of Electrogenerated HO Radical*. Doi 10.1016/j.talanta.2014.05.047
- Purnamawati, Y., Suyasa B, Mahardika. 2015. *Penurunan Kadar Rhodamin B dalam Air Limbah dengan Biofiltrasi Sistem Tanaman*. Ecotrophic vol 9 (02).
- Rana S. 2014. *Perspectives in Endocrine Toxicity of Heavy Metals-A Review*. Biol Trace Elem Res 160:1-14
- Reed BG, Carr BR. 2018. *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTtext.com, Inc.; 2000-. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>
- Rezende, F., Prior, K. K., Löwe, O., Wittig, I., Strecker, V., Moll, F et al. 2017. *Cytochrome P450 enzymes but not NADPH oxidases are the source of the NADPH-dependent lucigenin chemiluminescence in membrane assays*. Free Radical Biology and Medicine, 102, 57-66
- Ripaldy, I., Wijanarka, A., Putriningtyas, ND. 2017. *Analisis Kandungan Rhodamin B pada Cabai Merah Giling di Pasar Tradisional di Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta*. Ilmu Gizi Indonesia 01 (01) ISSN 2580-491x
- Sari, D. 2013. *Pengaruh Ekstrak Sambiloto (Andrographis paniculata Nees.) terhadap Siklus Reproduksi Mencit Swiss Webster*. UNP
- Sharma R., Qureshi, N., Mogra, S., Panwar K. 2012. *Lead Induced Infertility in Swiss Mice and Role of Antioxidants*. Universal Journal of Environmental Research and Technology 2 (2) 72-82
- Shen, J., Wu, Y, Zhang, B., Li, F. 2014. *Adsorption of Rhodamine B Dye by Biomimetic Mesoporous SiO<sub>2</sub> Nanosheets*. Technology Environmental Policy 17: 2289-2298





- Singh, P., Kesharwani, R., Keservani, R. 2017. *Antioxidants and Vitamins: Roles in Cellular Function and Metabolism*. Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity DOI 10.1016/B978-0-12-805413-0.00024-7
- Subandi, S. (2009). *Penentuan Kadar Arsen dan Timbal dalam pewarna Rhodamine B dan Auramine secara Spektrofotometri: Suatu Penelitian Pendahuluan*. MIPA dan Pembelajarannya, 28(1) 12-26.
- Sulistina, D.R., Ratnawati, R., Wiyasa, I.W.A. 2014. *Rhodamine B Increase Hypothalamic Cell Apoptosis and Disrupts Hormonal Balance in Rats*. Asian Pasific Journal of reproduction 3 (3): 180-183
- Sulistina, D.R., Ratnawati, R., Wiyasa, I.W.A. 2014. *Pengaruh Pemberian Rhodamin B terhadap Ekspresi Bax dan Bcl2 FSH dan LH pada Tikus (Rattus norvegicus) Galur Wistar Betina*. Fakultas Kedokteran. Univerisitas Brawijaya. Malang.
- Sumarmin, R. 2015. *Perkembangan Hewan*. Jakarta: Prenadamedia
- Tcchemicals. *Rhodamin B R0040*.  
<https://www.tcchemicals.com/eshop/en/in/commodity/R0040/?jsessionid=A662F4C40D938B7A93BE037E64213082>
- Tahan, G., Aytac, E., Aytekin, H., Gunduz, F., Dogusoy, G., Aydin, S., ... Uzun, H. (2011). *Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats*. Canadian Journal of Surgery, 54(5), 333–338. <http://doi.org/10.1503/cjs.013610>
- Trabe, M., Stevans, J. 2011. *Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective*. Free Radic Biol Med : 51 (5): 1000-1013.
- Twaroski, T., O'Brien M., Larmonier, N., Glauert, H., Robertson, L. 2000. *Polychlorinated Biphenyl-Induced Effects on Metabolic Enzymes, AP-1 Binding, Vitamin E, and Oxidative Stress in the Rat Liver*. Toxicology and Applied Pharmacology (171) 85-93 DOI: 10.1006/taap.2000.9114
- Vissers, M., Lee, W G., Hampton M. 2001. *Regulation of Apoptosis by Vtamin C*. The Journal of Biological Chemistry 276 (50) pp 46835-46840. DOI 10.1074/jbc.M107664200
- Wedhasari, A. 2014. *Peran Antioksidan bagi Kesehatan*. Jurnal Biotek Medisiana Indonesia vol 3(2): 59-68
- Widayati, E., 2019. *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant*. Biokimia FK Unissula Semarang
- Woldemeskel, M. 2004. *Toxicologic Pathology of the Reproductive System*. Reproductive and Developmental Toxicology DOI: 10.1016/B978-0-12-804239-7.00064-0
- Roth, Z. 2018. *Reduction in Oocyte Developmental Competence by Stress is Associated with Alterations in Mitochondrial Function*. American Dairy Science Association 101:1-13 doi. 10.3168/jds.2017-13389



Ryan, M.J., Dudash J.H., Docherty, M., et all. 2010. *Vitamin E and C Supplementation Reduces Oxidative Stress, Improves Antioxidant Enzymes and Positive Muscle Work in Chronically Loaded Muscles of Aged Rats*. Exp Gerontol 45 (11): 882-895

Yamlean, P. 2011. *Identifikasi dan Penetapan Kadar Rhodamin B pada jajanan Kue Bewarna Merah Muda yang Beredar di Kota Manado*. Jurnal Ilmiah Sains Vol 11 (02)

Yuslianti, E.R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish











## Lampiran 2. Analisis Data

### Tes Normalitas

#### Tests of Normality

	Kolmogorov -Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lama Siklus Estrus	.156	25	.121	.973	25	.716

a. Lilliefors Significance Correction

### Oneway

#### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	5	.060	.1342	.0600	-.107	.227	.0	.3
K+	5	.500	.3082	.1378	.117	.883	.3	1.0
P1	5	.120	.2683	.1200	-.213	.453	.0	.6
P2	5	.300	.0000	.0000	.300	.300	.3	.3
P3	5	.120	.2683	.1200	-.213	.453	.0	.6
Total	25	.220	.2646	.0529	.111	.329	.0	1.0

### Tes Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Lama Siklus Estrus

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
2.833	4	20	.052

#### ANOVA

Lama Siklus Estrus

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.652	4	.163	3.171	.036
Within Groups	1.028	20	.051		
Total	1.680	24			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lama Siklus Estrus

LSD

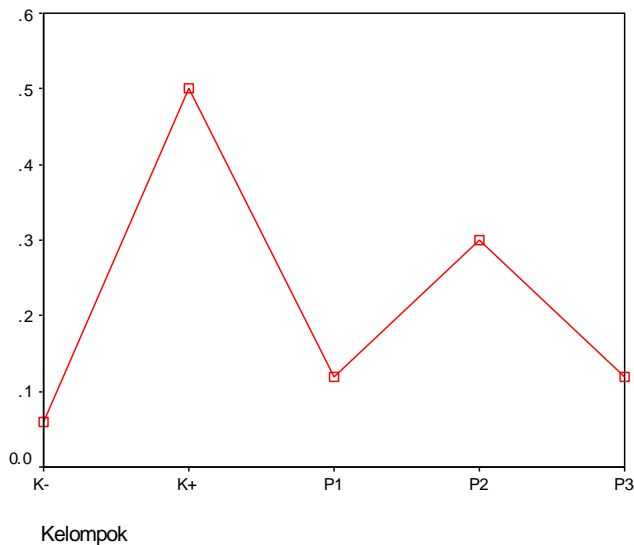
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-,4400*	,1434	,006	-,739	-,141
	P1	-,0600	,1434	,680	-,359	,239
	P2	-,2400	,1434	,110	-,539	,059
	P3	-,0600	,1434	,680	-,359	,239
K+	K-	,4400*	,1434	,006	,141	,739
	P1	,3800*	,1434	,015	,081	,679
	P2	,2000	,1434	,178	-,099	,499
	P3	,3800*	,1434	,015	,081	,679
P1	K-	,0600	,1434	,680	-,239	,359
	K+	-,3800*	,1434	,015	-,679	-,081
	P2	-,1800	,1434	,224	-,479	,119
	P3	,0000	,1434	1,000	-,299	,299
P2	K-	,2400	,1434	,110	-,059	,539
	K+	-,2000	,1434	,178	-,499	,099
	P1	,1800	,1434	,224	-,119	,479
	P3	,1800	,1434	,224	-,119	,479
P3	K-	,0600	,1434	,680	-,239	,359
	K+	-,3800*	,1434	,015	-,679	-,081
	P1	,0000	,1434	1,000	-,299	,299
	P2	-,1800	,1434	,224	-,479	,119

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.





### Means Plots



## Lampiran 3. Surat Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755  
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 348 / EC / KEPK – S1 – KB / 12 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Pengaruh Pemberian Vitamin C dan Vitamin E terhadap Siklus *Estrus*, Jumlah *Folikel* dan *Proliferasi Sel Epitel Serviks* Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Betina yang Diberi *Rhodamin B*.

**PENELITI** : Maulida Diah Setiawati  
Elsa Amelya  
Rizky Kurniasari

**UNIT / LEMBAGA** : S1 Kebidanan – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Malang,  
Ketua,

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)  
NIPK. 20180246051611001

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy.  
Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).





#### Lampiran 4. Dokumentasi

##### Prosedur Penelitian

##### a. Dibagi menjadi 5 kelompok



##### b. Memberi makan



##### c. Membuat Dosis Rhodamin B





d. Membuat Dosis vitamin



Membuat Vitamin E



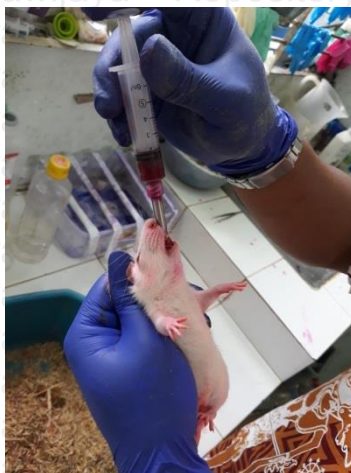
Membuat Vitamin C







e. Memberi Rhodamin B



f. Memberi Vitamin C dan Vitamin E



g. Menimbang tikus





h. Melakukan Swab Vagina



i. Melakukan Pengamatan Slide







### Lampiran 5. Curriculum Vitae

Nama : Maulida Diah Setiawati  
NIM : 155070600111006  
Jurusan/Angkatan : PSKB/2015  
Tempat, Tanggal Lahir : Semarang, 18 Agustus 1997  
Jenis Kelamin : Perempuan  
Kewarganegaraan : Indonesia  
Agama : Islam  
Alamat di Malang : Jl.Landungsari  
Alamat Email : maulidadiah@gmail.com  
Motto hidup : Man Jadda Wajada

### LATAR BELAKANG PENDIDIKAN

2001 – 2003 TKIT Permata  
2003 – 2009 SDN Sumbergirang II  
2009 – 2012 SMP Negeri 1 Puri Mojokerto  
2012 – 2015 SMA Negeri 1 Puri Mojokerto  
2015 – 2019 Program Studi Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

