

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI JARAK
PAGAR (*Jatropha curcas* L) SEBAGAI KONTRASEPSI
BETINA DENGAN MELIHAT SIKLUS ESTRUS
DAN JUMLAH FOLIKEL DE GRAAF
PADA TIKUS (*Rattus novergicus*)**

SKRIPSI

Oleh:
ANGELIA PRIMAJAYANTI
155130101111053



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI JARAK
PAGAR (*Jatropha curcas* L) SEBAGAI KONTRASEPSI
BETINA DENGAN MELIHAT SIKLUS ESTRUS
DAN JUMLAH FOLIKEL DE GRAAF
PADA TIKUS (*Rattus novergicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ANGELIA PRIMAJAYANTI

155130101111053



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L)
sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Siklus Estrus dan Jumlah
Folikel de Graaf pada Tikus (*Rattus novergicus*)**

Oleh:

ANGELIA PRIMAJAYANTI

NIM. 155130101111053

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung Pramana W. M., M.Si

NIP. 196506161991111001

drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet

NIP. 198805182015041003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarmito Setyo Yuwono, M.App.Sc

NIP. 196312161988031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Angelia Primajayanti

NIM : 155130101111053

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Siklus Estrus dan Jumlah Folikel de Graaf pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Juli 2019

Yang menyatakan,

(Angelia Primajayanti)

NIM.155130101111053

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L)
Sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Siklus Estrus dan Jumlah Folikel
de Graaf pada Tikus (*Rattus novergicus*)**

ABSTRAK

Kontrasepsi merupakan pencegahan terjadinya kehamilan akibat dari fertilisasi. Kontrasepsi digunakan untuk mengontrol peningkatan populasi hewan peliharaan agar terhindar dari rendahnya tingkat kesejahteraan hewan dan penyebaran penyakit zoonosis. Tujuan penelitian adalah untuk menindaklanjuti peningkatan populasi hewan peliharaan, dilakukan dengan ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) untuk melihat siklus estrus dari sitologi ulas vagina dan jumlah folikel de Graaf. Penelitian menggunakan 4 kelompok dan 5 ulangan tikus betina fertil (*Rattus novergicus*) galur wistar dengan berat badan 200 gram dari penelitian eksperimen di laboratorium Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Kelompok perlakuan dibagi menjadi kontrol negatif dan padiberi ekstrak biji jarak pagar, P1 dosis 10 mg/Kg BB, P2 dosis 50 mg/Kg BB, dan P3 dosis 100 mg/Kg BB setiap pagi dan sore selama 14 hari. Senyawa saponin dan alkaloid pada ekstrak biji jarak pagar dapat menurunkan FSH dan LH berpengaruh terhadap siklus estrus yang dilihat dari sitologi ulas vagina berupa perpanjangan fase metestrus akibat rendahnya estrogen dan tingginya progesteron. Folikel de Graaf diamati dari histopatologi ovarium, terlihat peluruhan dan pelonggaran sel granulosa, piknotik sel granulosa dan oosit, serta sel granulosa terlepas dari membran basal. Data jumlah folikel de Graaf dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok P1, P2, dan P3 dibandingkan kontrol negatif. Penurunan jumlah folikel de Graaf terbesar terjadi pada kelompok P3 sebesar 0,2. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak biji jarak pagar dapat memperpanjang siklus estrus berupa fase metestrus dan menyebabkan penurunan jumlah folikel de Graaf, sehingga dapat digunakan sebagai kontrasepsi betina.

Kata Kunci: *Biji jarak pagar (Jatropha curcas L), antifertilitas, siklus estrus dan histopatologi ovarium.*

**Effect of Giving *Jatropha* Seed (*Jatropha curcas* L) Extract for Female
Contraception by Looking at Estrus Cycle and De Graaf's
Follicle Amount in *Rattus novergicus***

ABSTRACT

Contraception is a prevention of pregnancy due to fertilization. Contraception is used to control an increase in the pet population to avoid low levels of animal welfare and the spread of zoonotic diseases. The aim of the study was to follow up the increase in the pet population, carried out by extracting *jatropha* seeds (*Jatropha curcas* L) to see the estrus cycle from the vaginal cytology and de Graaf's follicle count. The study used 4 groups and 5 replications of fertile *Rattus novergicus* female wistar rats weighing 200 grams from a laboratory randomized complete design (RAL) study. The treatment group was divided into negative controls without being given extraction of *jatropha* seeds, P1 dose 10 mg / Kg BB, P2 dose 50 mg / Kg BB, and P3 dose 100 mg / Kg BB every morning and evening for 14 days. Saponin and alkaloid compounds in extraction of *jatropha* seeds can reduce FSH and LH affect the estrus cycle seen from vaginal cytology in the form of an extension of the metestrus phase due to low estrogen and high progesterone. De Graaf follicles were observed from ovarian histopathology, visible decay and loosening of granulosa cells, piknotik granulosa cells and oocytes, and granulosa cells detached from the basement membrane. Data from de Graaf follicles were analyzed by ANOVA and continued with Duncan test. The results showed that there were significant differences between groups P1, P2, and P3 compared to negative controls. The largest decrease in the number of de Graaf follicles occurred in the P3 group of 0.2. The conclusion of this study is the extraction of *jatropha* seeds can extend the estrus cycle in the form of metestrus phase and cause a decrease in the number of de Graaf follicles, so that it can be used as female contraception.

Keywords: *Jatropha curcas* L, antifertility, estrus cycle and histopathology of ovarium.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas berkat dan anugerahNya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun proposal penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Siklus Estrus dan Histopatologi Ovarium pada Tikus (*Rattus norvegicus*)” sebagai tugas akhir/skripsi dan syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan proposal skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada :

1. Dr. Ir. Sudarmito Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
2. Dr. Agung Pramana W.M., M.Si selaku pembimbing 1 dan drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet selaku dosen pembimbing 2 atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Desi Wulansari, M.Vet selaku dosen penguji 1 dan drh. Aldila Noviatri, M.Biomed selaku dosen penguji 2 atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
4. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen pembimbing akademik atas bimbingannya dalam mengambil keputusan akademik

5. Seluruh Civitas Akademik (dosen dan karyawan) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah membantumu memfasilitasi penulisan skripsi.
6. Keluarga tercinta yaitu Ayah Suntoro Pinardi, Ibu Sri Milasari, Adik pertama Dzakwanda Primajayanti, dan Adik kedua Azkadina Primajayanti, serta keluarga besar yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dukungan, pengorbanan moral maupun materi kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Seluruh rekan Asisten Biokimia, Asisten Ilmu Bedah dan An-Nahl Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas segala motivasi, dukungan, bimbingan, dan kebersamaannya.
8. Rekan seperjuangan skripsi, sahabat-sahabat tercinta dan seluruh angkatan 2015, terutama kelas C (*Classy class*) atas segala perhatian, semangat, penghargaan, ajaran, motivasi, dukungan, kebersamaan, dan doa yang telah diberikan dalam meraih mimpi.
9. Semua pihak yang telah membantumu dalam penyelesaian penulisan karya tulis skripsi yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritikan dan saran yang membangun dari semua pihak. Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca. Aamiin.

Malang, 25 Juli 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.	ii
HALAMAN PENGESAHAN.	iii
ALAMAN PERNYATAAN.	iv
ABSTRAK.	v
ABSTRACT.	vi
KATA PENGANTAR.	vii
DAFTAR ISI.	ix
DAFTAR TABEL.	xi
DAFTAR GAMBAR.	xii
DAFTAR LAMPIRAN.	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumus Permasalahan Penelitian	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kontrasepsi.....	6
2.2 Tanaman Jarak Pagar (<i>Jatropha curcas L</i>)	8
2.1.1 Biji Jarak Pagar (<i>Jatropha curcas L</i>).....	9
2.3 Tikus Betina (<i>Rattus novergicus</i>).....	13
2.4 Anatomi dan Fisiologi Ovarium Tikus (<i>Rattus novergicus</i>).	15
2.5 Siklus Estrus.....	17
2.6 Histologi Folikel Ovarium	20
2.7 Hormon.....	24
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ..	28
3.1 Kerangka Konsep	28
3.2 Hipotesis Penelitian.....	32
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	34
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	34
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	34
4.3 Sampel Penelitian	35
4.4 Rancangan Penelitian	35
4.5 Variabel Penelitian	36
4.6 Tahapan Penelitian	37
4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....	37
4.6.2 Pembuatan Ekstraksi Biji Jarak Pagar (<i>Jatropha curcas L</i>).....	37
4.6.2.1 Identifikasi Golongan Saponin.	38
4.6.2.2 Identifikasi Golongan Alkaloid.	38
4.6.3 Pemberian Perlakuan kepada Tikus	39

4.6.4 Ulas Vagina	39
4.6.5 PembuatanPreparatHistologi.....	39
4.6.6Pewarnaan Menggunakan Hematoxylin Eosin (HE).	40
4.7 Analisa Data	41
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	42
5.1 PengaruhPemberianEkstraksiBijiJarakPagar (<i>Jatrophone curcas</i> L)sebagaiKontrasepsiBetinadenganMelihatSiklus Estrus pada Tikus (<i>Rattus novergicus</i>)	42
5.2 PengaruhPemberianEkstraksiBijiJarakPagar (<i>Jatrophone curcas</i> L)sebagaiKontrasepsiBetinadenganMelihatSiklus Estrus pada Tikus (<i>Rattus novergicus</i>).	48
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	60



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Gambar siklus estrus	19
2.2 Perkembanganfolikel.....	22
4.1 Rancangan penelitian.	36
5.1 Rata-rata jumlah folikel de Graaf pada tikus (<i>Rattus novergicus</i>).	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman jarak pagar (<i>Jatropha curcas L.</i>)	9
2.2 Biji jarak pagar (<i>Jatrophone curcas L.</i>)	10
2.3 Strukturkimia saponin.	11
2.4 Interaksi saponin dengan membrane sel.....	12
2.5Strukturkimia alkaloid.....	12
2.6Penghambat aromatase tipe I, II, dan III.	13
2.7Tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>) strain Wistar.....	14
2.8Sistemreproduksitikusbetina.	15
2.9 Ovarium.....	17
2.10 Sel – selepitel vagina.....	18
2.11Persinyalan FSH dan LH denganreseptor.	25
2.12Sintesisesterogen dan progesteron.....	27
5.1 Gambar siklus estrus tikus (<i>Rattus novergicus</i>)selama 14 hari.	42
5.2 Ulas vagina pada tikus (<i>Rattus novergicus</i>) dengan pewarnaan giemsa. ...	43
5.3Histopatologi folikel de Graaf tikus (<i>Rattus novergicus</i>) dengan pewarnaan hematoxylin eosin (HE).....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. <i>Ethical Clearence</i>	61
2. KerangkaOperasional.	62
3. PerhitunganDosisEkstrakBijiJarakPagar (<i>Jatropha curcas</i> L).	63
4. Konversi LD50 EkstrakBijiJarakPagar (<i>Jatropha curcas</i> L) MencitkeTikus.	66
5. LangkahKerjaPenelitian.	67
6. Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).	68
7. TahapanEkstraksiBijiJarakPagar ((<i>Jatropha curcas</i> L).	69
8. KandunganEkstrakBijiJarakPagar (<i>Jatropha curcas</i> L).	70
9. Perhitungan Statistik Jumlah Folikel de Graaf.	71
10. Ulas vagina 14 hari pada tikus (<i>Rattus novergicus</i>).	73
11. DokumentasiPenelitian.	74



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
%	: Persen
±	: lebihkurang
×	: kali
/	: per
°C	: Drajatcelcius
α	: Alpha
β	: Beta
μm	:Mikrometer
BB	: Berat badan
cAMP	:Cyclic Adenosine Monophosphate
CH	: Corpus hemoragicum
CL	: Corpus luteum
cm	:Centimeter
ECD	: Ectracellular Domain
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
FSHR	: Follicle Stimulating Hormon Rceptor
g	: Gram
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
HE	:Hematoxylin Eosin
OH	: Ovariohycterectomy
K	: Kontrol
Kg	: Kilogram
LH	: Luteinizing hormone
LHR	: Luteinizing Hormone Receptor
mL	: Mililiter
P1	: Perlakuan 1
P2	: Perlakuan 2
P3	: Perlakuan 3
PFA	: Paraformaldehyde
PKA	: Protein Kinase-A
TMD	: Transmembrane Domain
VCD	: 4-vinylcyclohexene diepoxide



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

World Society for the Protection of Animal (WSPA) menyatakan Indonesia mengalami peningkatan populasi anjing sebesar 66% dan kucing 22% dalam waktu 5 tahun terakhir. Peningkatan populasi hewan peliharaan tahun 2007 terhadap anjing sebanyak 8 juta ekor, kucing 15 juta ekor, sedangkan secara global Indonesia berada di urutan ke-5 sebesar 23 juta ekor hewan peliharaan (Nurlayli dan Hidayati, 2014). Populasi hewan peliharaan yang meningkat berdampak pada tidak terurusnya hewan peliharaan, sehingga mengakibatkan ketergantungan hewan terhadap manusia, rendahnya tingkat kesejahteraan hewan, serta terjadinya penyebaran penyakit zoonosis yang dapat menyebabkan kematian pada manusia (Sulistiyarini dan Fadilla, 2017).

Solusi yang dilakukan terhadap peningkatan populasi dengan menggunakan kontrasepsi yang terbagi atas dua cara, yaitu kontrasepsi teknik pembedahan dan tanpa bedah. Kontrasepsi teknik pembedahan pada hewan betina berupa OH (*Ovariohysterectomy*) membuat hewan menjadi infertil dengan pengangkatan uterus dan ovaum, namun OH memiliki harga yang mahal (Sulistiyarini dan Fadila, 2017). Kontrasepsi tanpa pembedahan dapat menggunakan bahan kimia atau hormonal seperti pemberian GnRH agonis, GnRH antagonis, dan VCD (*4-vinylcyclohexenediepoxyde*), kekurangan penggunaan

kontrasepsi GnRH agonis dan antagonis menimbulkan efek nyeri, pendarahan, lesi,



dan edema pada hewan (Borgesdkk., 2015).sedangkan VCD pemakaian terus menerus dalam jangka waktu panjang akan mengakibatkan karsinogenik pada hewan (Kapper dan Hoyer, 2012).

Tindakan yang dilakukan dalam mengatasi peningkatan populasi anjing dan kucing yang belum optimal, maka peneliti menggunakan tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai tanaman obat antifertilitas alami yang digunakan pada bagian biji. Biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) diekstraksi dengan pelarut etanol 70% menghasilkan kandungan senyawa saponin dan alkaloid (Arini, 2012). Saponin jenis triterpenoid sebagai senyawa antifertilitas hormonal memiliki sifat esterogenik dengan meningkatnya kadar esterogen didalam darah, mengakibatkan terjadinya *feedback negative* pada hipotalamus menghambat sekresi hormon GnRH dalam menstimulasi FSH dan LH di hipofisa anterior menjadi rendah, sehingga perkembangan folikel menjadi terganggu (Rusmiati, 2010). Senyawa antifertilitas alkaloid bekerja dengan cara menghambat aromatase tipe III pada proses sintesis estrogen yang dapat menurunkan estrogen (Yakubu dkk., 2008). Estrogen yang mengalami penurunan menyebabkan *feedback negative* menghambat hipotalamus dalam mensekresi GnRH, sehingga hipofisa anterior mengalami penurunan dalam menstimulasi FSH dan LH yang mengakibatkanterganggunya proses perkembangan folikel (Cynthia dkk., 2015).

Siklus estrus dikendalikan oleh hormon FSH, LH, estrogen, dan progesteron yang dapat dilihat dari sel epitel vagina pada fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Normalnya, fase proestrus terjadi selama 12 jam, estrus 12 jam, metestrus 21 jam, dan diestrus selama 60 jam, namun pemberian ekstrak biji

jarak (*Jatropha curcas* L) mengalami *feedback negative* dengan menghambat hipotalamus dalam mensekresi GnRH yang menstimulus penurunan FSH dan LH pada hipofisa anterior, sehingga mengganggu perkembangan folikel dan memperpanjang waktu ovulasi, mengakibatkan terganggunya siklus estrus sehingga menunda memasuki waktu birahi yang membuat betina tidak bersedia menerima pejantan (Novriyanti dkk., 2014).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap siklus estrus dan jumlah folikel de Graaf ovarium pada tikus betina (*Rattus novergicus*) yang sesuai dengan rumusan masalah dibawah ini.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat mempengaruhi siklus estrus?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat mempengaruhi jumlah folikel de Graaf ovarium secara mikroskopis ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan-batasan penelitian diperlukan untuk menghindari meluasnya permasalahan penelitian, sehingga pembahasan tidak menyimpang dari rumusan masalah. Adapun batasan masalah pada penelitian ini sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) betina, berat badan 200 gram, kondisi fertil pernah melahirkan dengan fase estrus yang tidak diketahui.

2. Hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB).
3. Biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) diperoleh dari tanaman masyarakat daerah Sidoarjo. Pembuatan ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan menggunakan pelarut etanol 70%.
4. Ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) diberikan dengan menggunakan sonde lambung pada dosis 10 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, dan 100 mg/Kg BB setiap dua hari sekali selama 14 hari.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah siklus estrus yang dilihat dari ulas vagina dan gambaran jumlah folikel de Graaf ovarium.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui efek pemberian ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat mempengaruhi siklus estrus yang dilihat dari sitologi ulas vagina.
2. Mengetahui efek pemberian ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat mempengaruhi jumlah folikel de Graaf ovarium secara mikroskopis.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Akademis

Menjadi teori dasar untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan dari ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai antifertilitas yang dapat dijadikan kontrasepsi hewan betina.

2. Manfaat Praktisi

Menjadi informasi dalam meningkatkan pengetahuan ekstraksi biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) pada siklus estrus yang dilihat dari ulas vagina dan jumlah folikel de Graaf ovarium, serta menjadi rujukan pengembangan penelitian tentang kontrasepsi betina yang aman, praktis, dan efektif digunakan untuk masa depan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kontrasepsi

Kontrasepsi yang berasal dari penggalan kata kontra yang memiliki arti mencegah dan konsepsi berarti pertemuan sel telur dengan sel sperma yang dapat menyebabkan kehamilan. Kontrasepsi merupakan pencegahan kehamilan akibat dari pertemuan antara sel telur dengan sel sperma. Syarat kontrasepsi yang baik digunakan tidak berbahaya, pemakaian jangka waktu panjang, pengaplikasian sederhana, dan murah. Cara kerjanya secara umum kontrasepsi dapat mencegah ovulasi, mengentalkan lendir pada serviks, dan mencegah terjadinya pertemuan sel telur dengan sperma (Hartanto, 2003).

Penggunaan kontrasepsi pada anjing dan kucing betina dapat dilakukan dengan dua cara yaitu teknik pembedahan dan tanpa pembedahan. Kontrasepsi betina dengan pembedahan berupa OH (*Ovariohysterectomy*) yang merupakan pengangkatan ovarium dan uterus pada organ reproduksi betina, sehingga tidak dapat mengalami fertilisasi. Pembedahan OH (*Ovariohysterectomy*) dapat membuat hewan lebih jinak, tidak birahi, dan memacu pertumbuhan berat badan (Sardjana, 2013). Kontrasepsi tanpa pembedahan dapat menggunakan bahan kimia atau hormonal seperti GnRH agonis, GnRH antagonis, dan VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide).

- GnRH Agonis

Superlorin merupakan contoh kontrasepsi betina dari peptida kecil GnRH agonis yang bekerja merangsang pelepasan FSH dan LH, paparan GnRH agonis secara terus menerus menyebabkan *down-regulasi* reseptor GnRH, sehingga mengalami penurunan FSH dan LH. Superlorin diberikan dengan dosis 4,7 mg secara subkutan memiliki efek yang ditimbulkan seperti rasa nyeri dari pembengkakan, pendarahan kapiler kecil, lesi diareal induksi, dan edema ringan selama 2 – 3 hari (Borges dkk., 2015).

- GnRH Antagonis

Cetrorelix merupakan contoh generasi ketiga GnRH antagonis bekerja secara kompetitif pada reseptor GnRH, sehingga menghambat GnRH menstimulus hipofisis anterior untuk menghasilkan FSH dan LH. Rendahnya FSH dan LH menyebabkan terganggunya perkembangan folikel. Cetrorelix dilakukan pemberian subkutan dengan dosis 0,25 mg per hari. Efek yang ditimbulkan dari pemberian cetrorelix berupa rasa nyeri dan pembengkakan (Cocci dkk., 2004).

- VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide)

VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide) merupakan kontrasepsi oral pada hewan betina dapat mempercepat resorpsi folikel primordial ovarium yang menyebabkan tidak muncul perilaku estrus dan kemandulan permanen (Briggs, 2013). Mekanisme VCD memberikan *feedback negatif* terhadap hipotalamus dalam melepaskan GnRH untuk mensintesis FSH dan LH pada hipofisis anterior. Paparan VCD

secara terus menerus menyebabkan sedikitnya sintesis FSH dan LH, sehingga mempercepat terjadinya atresia folikel primordial. Pemberian VCD dalam jangka waktu panjang akan mengakibatkan karsinogenik (Kapper dan Hoyer, 2012).

2.2 Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas. L*)

Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas. L*) berasal dari daerah tropis Amerika Selatan yang dibawa oleh Portugis ke Asia menjadi berkembang hampir diseluruh wilayah Indonesia sebagai sumber energi alternatif berkualitas tinggi pada biji dan minyak tanaman jarak (Gedoandkk., 2013). Berikut klasifikasi dari tanaman jarak pagar (Gudeta, 2016):

Subkingdom : Angiosperms
 Divisi : Tracheophyta
 Subdivisi : Spermatophytina
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Malpighiales
 Famili : Euphorbaceae
 Genus : *Jatropha*
 Spesies : *Jatropha curcas Linn*

Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas L*) dapat tumbuh pada tanah yang rendah air seperti tanah berpasir, tanah liat, dan berbatuan. Tanaman jarak pagar memiliki ciri – cirinya daun menjari dengan 3 – 5 lekukan, panjang 6 – 16 cm dan lebar 5 – 15 cm (**Gambar 2.1**). Bunga memiliki 5 helai mahkota dan akan tumbuh saat berumur 3 – 4 bulan, penyerbukan terjadi pada putik oleh benang

sari, dan berakartunggang. Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L) memerlukan waktu 60 – 70 hari dari masa berbunga hingga berbuah masak, buah masih muda berwarna hijau dan buah yang masak berwarna kuning –



coklat (Sarimole, 2014). Tanaman jarak pagar paling banyak berbuah saat musim gugur terdapat dalam satu tandan lebih dari 10 buah dan 3 biji pada satu buah yang mengering (Nurcholis dan Sumarsih, 2007).

Gambar 2.1 Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L) (Gudeta, 2016)

2.2.1 Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L)

Menurut Nurcholis dan Sumarsih (2007), tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L) mempunyai biji yang berwarna coklat kehitaman. Biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) ukuran panjang 11 – 30 mm dan lebar 7 – 11 mm (**Gambar 2.2**). Komposisi dari kandungan biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) antara lain protein 18,2%, lemak 38%, air 6,62%, dan karbohidrat 38% (Harimurti dan Sumangat, 2011). Kandungan senyawa kimia aktif yang dimiliki dari biji jarak pagar berupa saponin, alkaloid, dan curcin. Biji jarak juga mengandung minyak sebesar 35 – 45% dengan kandungan berupa trigliserida asam palmitat, stearat, dan kurkanolat

(Wahyu dkk., 2016). Agensi bijiarak dapat sebagai antifertilitas yang disebut dengan *jatrophone* (Puspitadewi, 2007).



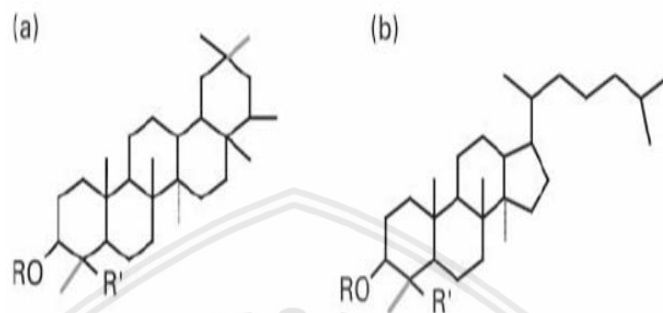
Gambar 2.2 Bijiarak pagar (*Jatrophonecurcas L.*) (Laxane, 2013)

Mekanisme antifertilitas pada dasarnya bekerja dengan dua cara, yaitu secara efek hormonal dan sitotoksik (Rusmiati, 2010). Senyawa aktif dari kandungan bijiarak sebagai antifertilitas dari hasil pengekstraksian menggunakan etanol 70% ialah saponin dan alkaloid (Arini, 2012). Berikut penjelasan dari masing – masing senyawa :

a. Saponin

Saponin dalam bahasa latin “sapo” yang berarti sabun sehingga dalam pengujian saponin akan membentuk busa jika dikocok (Minarno, 2016). Bijiarak memiliki kandungan saponin sebesar 2,33% (Setyaningsih dkk., 2014). Saponin berasal dari senyawa glikosida kompleks yang dihasilkan oleh tanaman yang tidak larut pada etertetapi larut air (Yanuarto dkk., 2008). Saponin berdampak negatif pada organ reproduksi seperti aborsi, sterilisasi, dan menghentikan proses kehamilan (Puspitasari, 2014).

Saponin yang merupakan glikosida secara hidrolisis terdiridari aglikon dan glikon (**Gambar 2.3**). Saponin aglikon menghasilkan sapogenin yang



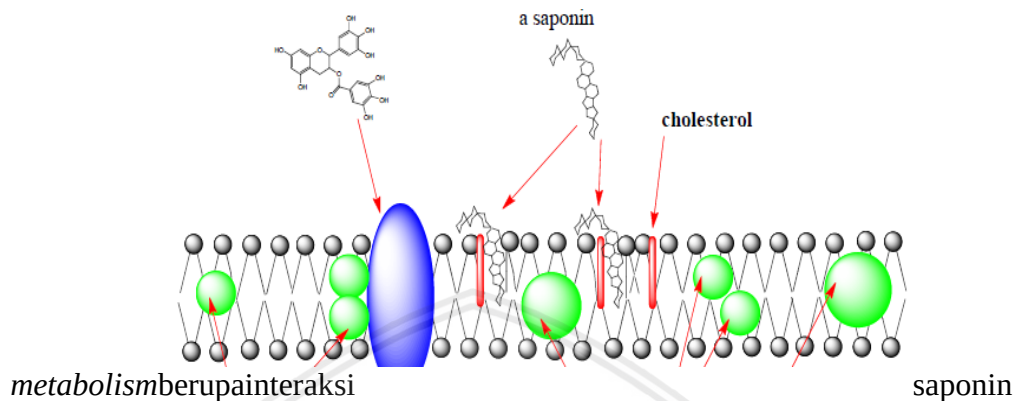
bersifat netral dan asam, sapogenin netral termasuk turunan steroid yang memiliki rantai samping spiroketal yang ada pada tumbuhan angiosperm monokotil, sedangkan sapogenin asam dengan struktur triterpenoid pada tumbuhan angiosperm dikotil. Saponin glikon menghasilkan gula dengan kandungan seperti glukosa, galaktosa, xilosa, asam glukuronat, dan rhamnosa (Desai dkk., 2009).

Gambar 2.3 Struktur kimia saponin. (a) triterpenoid, (b) steroid (Desai dkk., 2009)

Antifertilitas humoral saponin memiliki senyawa aktif pada tumbuhan dan mempunyai sifat estrogenik. Estrogenik akan meningkatkan estrogen dalam darah, sehingga menghambat hipofisis untuk mensekresikan hormon gonadotropin dengan *feedback negative* yang mengakibatkan rendahnya FSH, sehingga perkembangan folikel terhambat dalam ovarium (Rusmiati, 2010). Mekanisme dari efek sitotoksik yang dimiliki oleh saponin dapat merusak membran sel dengan peningkatan permeabilitas dari ikatan kompleks saponin, menyebabkan sel terjadi kebocoran dan keluarnya material interaseluler (Alfiandkk., 2018). Menurut Wink (2015),

rusaknya permeabilitas membran disebabkan

oleh *secondary*

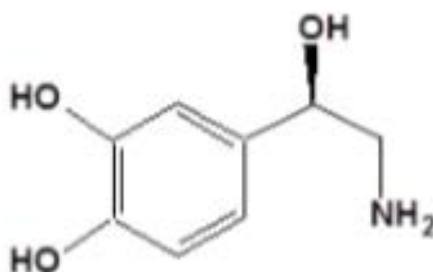


mengikat kolesterol membentuk kompleks *sequeimolecular* di membran, pada konsentrasi tinggi akan terjadi interaksi hidrofilik yang dibantu oleh α -hendirin mengakibatkan agregasi saponin dan kolesterol untuk membentuk pori-pori. Pori-pori membran yang terbentuk menyebabkan kebocoran material interaseluler. Mekanisme tersebut menjadi penyebab jumlah folikel de Graaf mengalami penurunan (**Gambar 2.4**).

Gambar 2.4 Interaksi saponin dengan membran sel (Wink, 2015)

b. Alkaloid

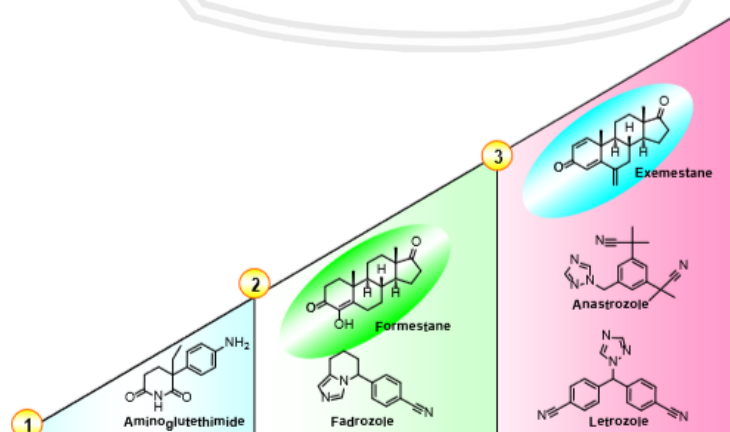
Alkaloid merupakan senyawa organik terbanyak dapat ditemukan dalam dan berasal dari tumbuhan (Batubara, 2017). Alkaloid dari metabolisme sekunder tumbuhan yang terdapat pada daun, kulit, batang, dan biji. Metabolis sekunder terdiri dari senyawa kimia yang berfungsi untuk bioaktivitas dan perlindungan pada tumbuhan (Aksaradkk.,



2013). Kandungan alkaloid pada biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) sebesar 2,85% (Nwokochadkk., 2011). Alkaloid menjadi bahan dasar sintesis hormon steroid sebagai kontrasepsi oral yang sangat mirip dengan saponin (Minarno, 2016).

Gambar 2.5 Struktur kimia alkaloid (Saifudin, 2014)

Alkaloid bekerja dengan menghambat aromatase pada proses sintesis estrogen, sehingga estrogen mengalami penurunan (Yakubu dkk., 2008). Penurunan estrogen berpengaruh terhadap *feedback negative* pada hipotalamus menghambat GnRH untuk menstimulus hipofisis anterior dalam sekresi FSH dan LH yang rendah, sehingga mengganggu perkembangan folikel (Cynthiadkk., 2015). Menurut Linardi dkk. (2017), penghambatan aromatase terbagi atas 3 tipe yaitu, tipe I merupakan steroid dan turunan androstenedion dari substrat alami aromatase yang bersifat *irreversible*, tipe II nonsteroid, dapat berikat dengan kelompok enzim P450 dan bersifat *reversible*,



sedangkan tipe III merupakan nonsteroid, menghambat pembentukan estron (E1)

dan estradiol (E2) yang efektif seperti anastrozole dan letrozole (**Gambar 2.6**).

Gambar 2.6 Penghambat aromatase tipe I, II, dan III (Shihua, 2014)

2.3 Tikus Betina (*Rattus novergicus*)

Menurut Kartika (2013), Taksonomi tikus putih (*Rattus novergicus*) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus novergicus</i>



Gambar 2.7 Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar (Akbar, 2010)

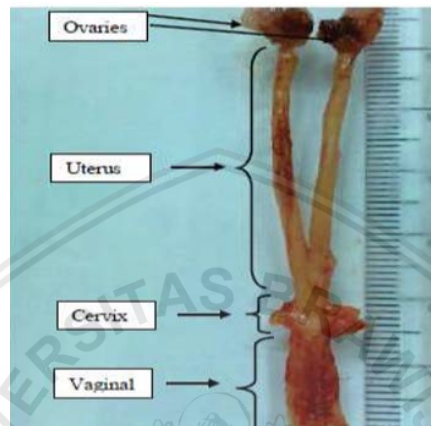
Tikus putih (*Rattus novergicus*) pada umur 60 – 90 hari akan mengalami dewasa kelamin, lama kebuntingan 20 – 22 hari, dan masa laktasi 21 hari (McNamara, 2006). Tikus dapat menghasilkan 15

ekor anaktikus dengan rata-rata 9 ekor anaktikus. Tiga galur pada tikus sebagai hewan percobaan laboratorium yaitu Long Evans, Sprague Dawley, dan Wistar (Akhbar, 2010). Tikus Long Evan memiliki ukuran badan lebih kecil dan terdapat warna hitam pada tubuh bagian depan dan kepala. Tikus Sprague-Dawley (SD) dengan bentuk kepala lebih sempit, tubuh panjang, telinga tebal, rambut halus berukuran pendek, tidak agresif, pertumbuhan yang cepat. Tikus Wistar pada (Gambar 2.7) berkarakteristik kepala yang lebar, telinga panjang, ekor sepanjang tubuhnya, serta lebih agresif (Sirois, 2005).

Komposisi pakan yang diberikan mengandung protein 10%, karbohidrat, lemak 3%, vitamin, mineral dan air (AOAC, 2005). Mekanisme kekurangan pakan pada tikus betina menyebabkan hipofungsi atau atrofi ovarium dengan menurunnya fungsi kelenjar tubuh seperti kelenjar hipofisis anterior menjadi hipofungsi yang dapat menurunkan sekresi GnRH, mengakibatkan penurunan FSH dan LH, sehingga rendahnya aktivasi ovarium, tidak terjadi pertumbuhan pada folikel yang ditandai anestrus, gangguan ovulasi dan gangguan pembuahan yang menyebabkan kecacatan pada embrio, sedangkan kelebihan pakan menyebabkan kegemukan atau obesitas dengan timbunan lemak di tubuh, terutama di sekitar ovarium dan bursa ovarium yang mengakibatkan tidak terjadi pembuahan, dikarenakan sel telur masuk ke dalam tuba fallopi terhalang untuk diovasikan dan tetap tertahan di bursa ovarium (Hariardi dkk., 2011).

2.4 Anatomi dan Fisiologi Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*)

Sistem reproduksi pada tikus betina terdiri dari sepasang ovarium dan saluran kelenar berupa oviduk, uterus, serviks, dan vagina (**Gambar 2.8**). Tikus memiliki bursa ovarium yang berfungsi menyelubungi ovarium (Hamid dan

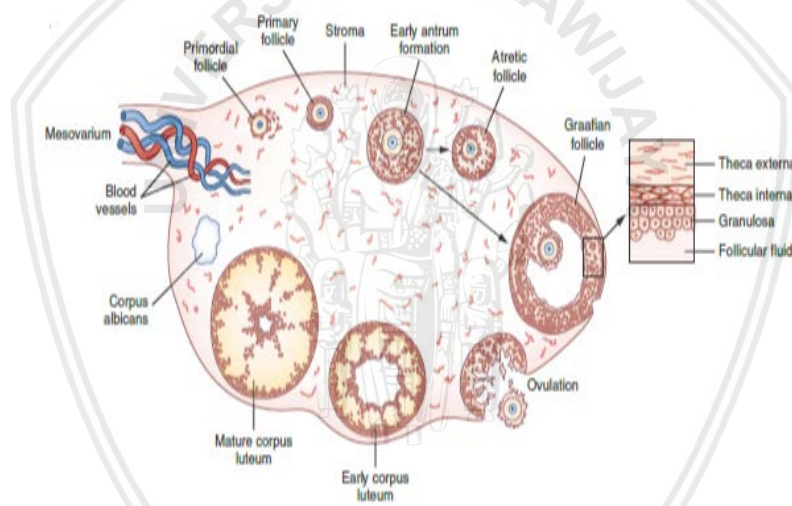


Zakaria, 2013).

Gambar 2.8 Sistem reproduksi tikus betina (Abdulghani, 2016)

Reproduksi betina memiliki gonad berupa ovarium. Ovarium memiliki dua fungsi pada organ reproduksi betina yaitu fungsi eksokrin sebagai penghasil telur (ovum) dan fungsi endokrin untuk menghasilkan hormon estrogen, progesteron, relaksin, aktivin, dan inhibin. Ovarium merupakan tempat berkembangnya folikel yang secara anatomi pada terbagi atas korteks (zona parenkimatos) yang terdapat jaringan ikat padat dan folikel-folikel ovarium yang berisi oosit (**Gambar 2.9**), serta medula (zona vakuolosa) yang berisi rongga pembuluh darah dan sedikit jaringan ikat (Bloom dan Fawcett, 1994). Hormon FSH berpengaruh dalam perkembangan folikel yang dimulai dari folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, dan folikel de Graaf, selanjutnya folikel pecah mengalami pelepasan ovum yang

dipengaruhi oleh hormon LH membentuk ovulasi. Menurut Campbell (2010), ovulasi terjadi dengan ditandai korpus hemoragik atau korpus rubrum dari ruang ovulasi yang seperti wadah berisi darah dan limfe yang mengalami luteinisasi. Luteinisasi merupakan proses terbentuknya korpus luteum dari sel granulosa dan sel teka. Korpus luteum memproduksi progesteron untuk mempertahankan kehamilan dan menekan estrogen, jika tidak terjadi kehamilan korpus luteum akan luruh membentuk korpus albicans (Tomac dkk., 2011).



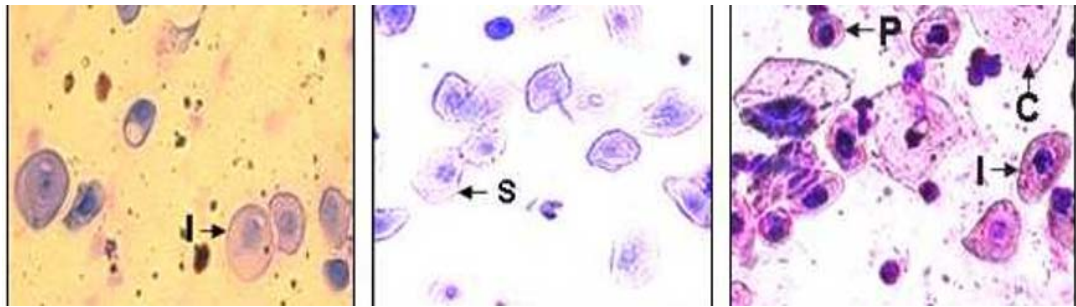
Gambar 2.9 Ovarium. (C) cortex, (M) medulla, (F) folikel, (CL) corpus luteum, (CA) corpus albicans, (TA) tunika albuginea (Norman dan Henry, 2015)

2.5 Siklus Estrus Tikus (*Rattus norvegicus*)

Siklus estrus tikus betina (*Rattus norvegicus*) berlangsung selama 4 – 5 hari yang terdapat empat fase, yaitu fase proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Goldman dkk., 2007). Siklus estrus dapat dilihat dengan ulas vagina yang digunakan untuk mengkaraktiriskan tahap siklus reproduksi, melihat kondisi saluran genital dan menentukan waktu kawin yang optimal. Sel – sel epitel vagina diklasifikasikan menjadi tiga jenis yaitu sel superfisial,

selintermediet, dan sel parabasal pada (**Gambar 2.10**). Menurut Sharma. (2016), ukuran sel superfisial berdiameter 40 – 65 μm , sel intermediet berdiameter 20 – 40 μm , dan sel parabasal berdiameter 12 – 15 μm . Ciri – ciri pada sel superfisial berbentuk poligonal, sitoplasma luas, pipih, tidak berinti, dan tidak ada leukosit. Sel parabasal berbentuk bulat dengan inti lebih besar dari sitoplasma. Sel intermediet dengan inti sel yang mengecil sehingga sitoplasma terlihat besar.





Gambaran 2.10 Sel – selepitel vagina. (I) Sel intermediet, (P) Sel parabasal, (S) Sel superfisial, dan (C) Kornifikasi (Goswamidkk., 2008)

a. Proestrus

Fase proestrus ditandai dengan sebagian sel parabasal dan terdapat beberapa leukosit (Gal dkk., 2014). Tikus putih mengalami fase proestrus selama 12 jam yang ditandai dengan perkembangan maksimum dari pertumbuhan folikel yang disebabkan oleh hormon FSH dan estrogen. Perubahan fisiologis pada fase proestrus terdapat peningkatan silia di tuba falopi dan pertumbuhan sel, vaskularisasi epitel vagina dan mukosa uterus, serta serviks mensekresikan mukus berlendir (Srinivasan dkk., 2017).

b. Estrus

Fase estrus berlangsung selama 12 jam dengan karakteristik utamanya estrogen, sehingga meningkatkan rangsangan gonadotropin dari hipofisa untuk mensekresi LH (*Luteinizing hormone*) dan mengalami ovulasi pada waktu singkat (Srinivasan dkk., 2017). Folikel yang mengalami ovulasi akan menjadi CH (*Corpus hemorrhagicum*) dan berubah menjadi CL (*Corpus luteum*). Fase estrus ditandai dengan adanya epitel superfisial dengan kornifikasi dan tidak ada leukosit (Gal dkk., 2014).

c. Metestrus

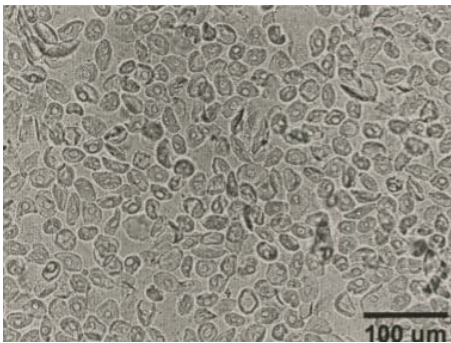
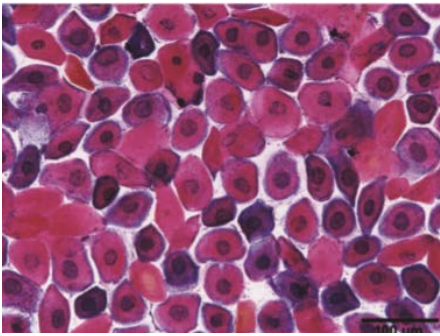
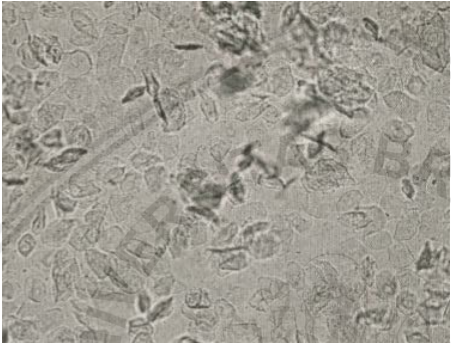
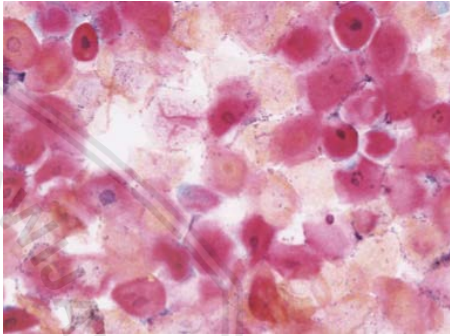
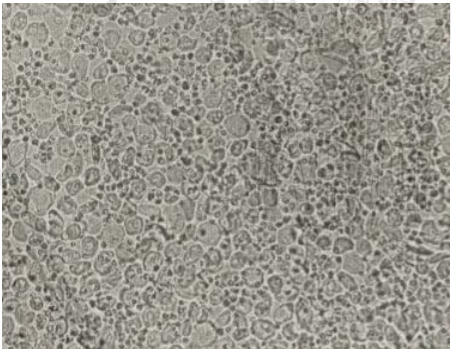
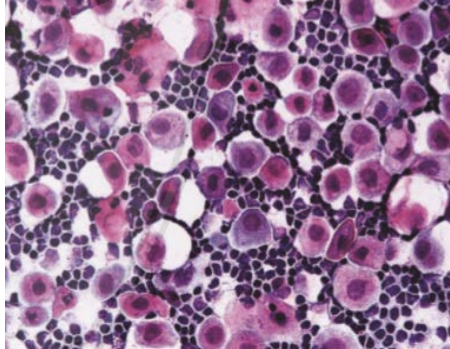
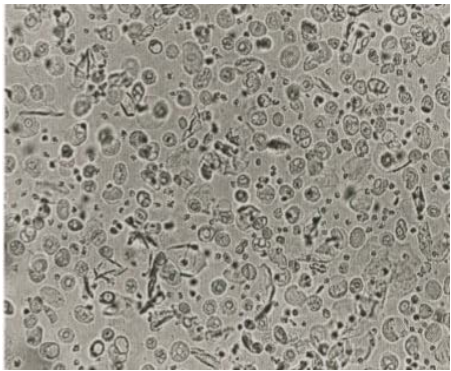
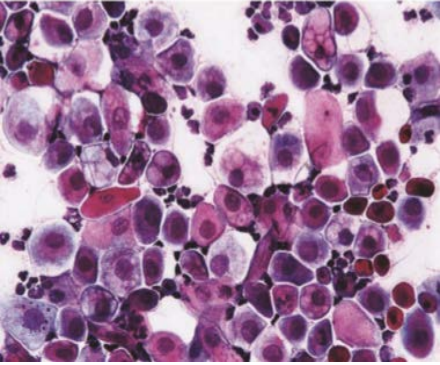
Fase metestrus berlangsung 21 jam pada tikus putih yang ditandai folikel de Graaf menjadi CL (*corpus luteum*) setelah ovulasi, saat terjadi kebuntingan hormone progesterone yang dihasilkan dari korpus luteum berperan menjaga selama proses kebuntingan, sedangkan jika tidak terjadi kehamilan saluran reproduksi dan uterus beregresi ke fase diestrus. Bentuk sel dari fase metestrus berupa sel epitel parabasal dan terdapat leukosit (Srinivasan dkk., 2017).

d. Diestrus

Fase diestrus dengan periode terpanjang 57 jam dalam siklus estrus (Srinivasan dkk., 2017). Fase diestrus memiliki kadar estrogen dan vaskularisasi rendah (Westwood, 2008). Awal fase diestrus ditandai dengan dominasi sel parabasal, sedangkan di pertengahan fase diestrus berkembang menjadi sel intermediet, serta fase diestrus memiliki leukosit yang mendominasi (Gal dkk., 2014). Siklus estrus pada saluran reproduksi mengalami perubahan pada setiap fase yang dilihat dari gambaranulus vagina (**Tabel 2.1**).

Tabel 2.1 Gambar siklus estrus

Fase Estrus	Gambar Siklus Estrus (Hubscher dkk., 2005)
-------------	--

Proestrus		
Estrus		
Metestrus		
Diestrus		

2.6 Histologi Folikel Ovarium

Folikulogenesis merupakan proses perkembangan folikel hingga matang yang berada di ovarium tikus betina (*Rattus norvegicus*). Perkembangan folikel bermula dari folikel primordial yang merupakan folikel primer untuk menjadi folikel sekunder, folikel tersier, dan folikel de Graaf (Bulun dan Adhasi, 2001) (**Tabel 2.2**).

a. Folikel Primer

Folikel primer merupakan tahapan pertama dari perkembangan folikel yang memiliki satu lapisan sel granulosa kuboid dan membran basal. Oosit mulai tumbuh dan dikelilingi oleh zona pellucida dari sintesis oosit dan sel granulosa. Folikel primer tidak semua berkembang hingga diovasikan, sebagian besar akan mengalami atresia sebelum menjadi folikel matang (Bulun dan Adhasi, 2001).

b. Folikel Sekunder

Folikel sekunder terdapat proliferasi sel-sel granulosa dan sel teka. Sel granulosa mensintesis reseptor FSH, estrogen, dan androgen (Wiknjosastro, 2005). Menurut Gartner dan Hiatt (2001), perbedaan folikel sekunder terhadap folikel primer yaitu posisi inti sedikit bergeser ketepi, zona pellucida dan membran basal mulai menebal, sel folikel memiliki 3 – 6 lapis.

c. Folikel Tersier

Folikel tersier terdapat rongga folikel atau atrium yang berisi cairan mengandung steroid, elektrolit, protein, dan proteoglikan. Hormon FSH menstimulus sel granulosa membentuk *cumulus oophorus*, *corona radiata*,

serta mensekresi aktivin untuk mempercepat folikulogenesis dan meningkatkan reseptor FSH dari estrogen yang bekerja sama dengan folikel agar dapat berproliferasi, namun tingginya estrogen mengakibatkan mekanisme *feedback negative* berupa inhibin ke hipofisis untuk menghambat sekresi FSH sehingga folikel menjadi atresia (Wiknjosastro, 2005).

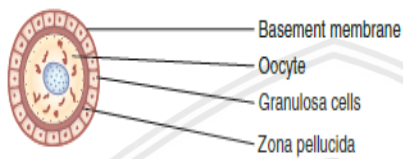
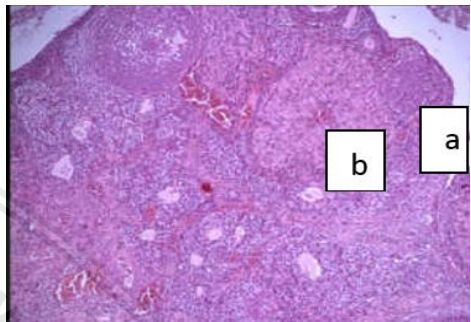
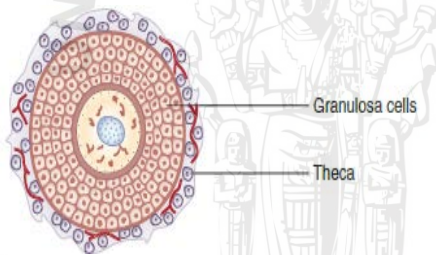
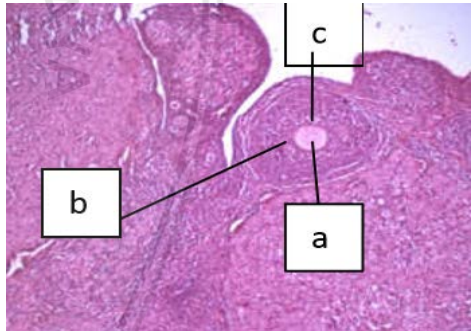
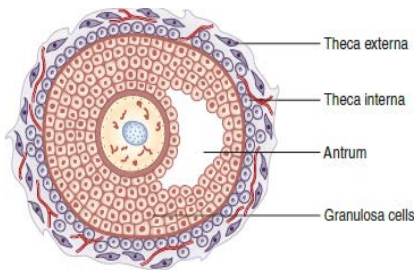
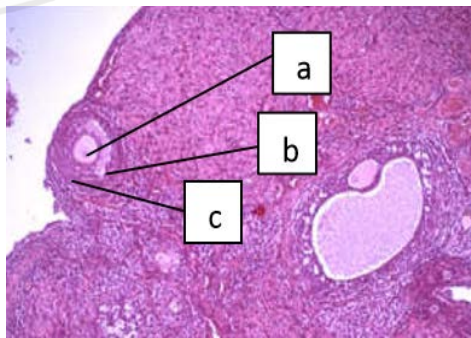
d. Folikel de Graaf

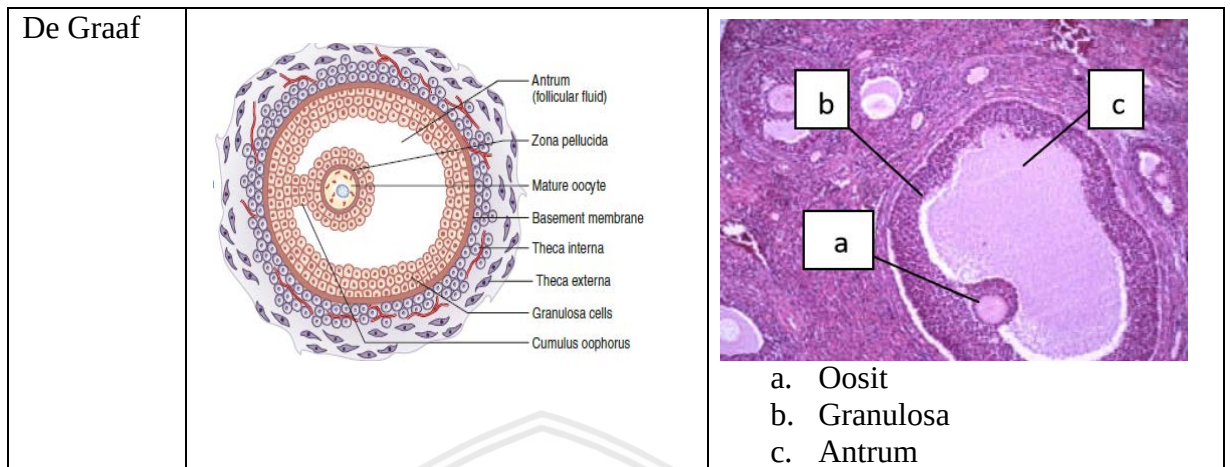
Folikel de Graaf merupakan folikel matang untuk menyeleksi folikel dominan yang akan diovolusikan. Atresi pada folikel antral yang berukuran lebih kecil disebabkan turunkan kadar FSH sehingga berkembangnya folikel dominan dengan mengakumulasi jumlah sel granulosal. LH meningkat menyebabkan ovulasi folikel de Graaf karena adanya mekanisme *feedback positive* dari tingginya kadar estrogen di dalam folikel (Wiknjosastro, 2005).

Folikel setelah mengalami ovulasi pada siklus hari ke-3 akan membentuk korpus hemoragikum yang terdapat eritrosit dan sedikit sel granulosal terakumulasi di dalam jaringan interstitial pada membran granulosal. Siklus hari ke-4 korpus hemoragikum menjadi korpus rubrum yang berwarna merah disebabkan dari aktivitas angiogenetik yang tinggi dan padatnya jaringan kapiler. Korpus rubrum pada minggu kedua terakumulasi lipokrom membentuk warna kuning yang

disebut korpus luteum, jika korpus luteum lisis akan menjadi korpus albicans (Diaz dan Rodriguez, 2010).

Tabel 2.2 Perkembangan dan histologi folikel

Fase Folikel	Perkembangan folikel (Norman dan Henry, 2015)	Histologi folikel (Rejekidkk., 2017)
Primer	 Basement membrane Oocyte Granulosa cells Zona pellucida	 a. Oosit b. Granulosa
Sekunder	 Granulosa cells Theca	 a. Oosit b. Granulosa c. Zona Pellucida
Tersier	 Theca externa Theca interna Antrum Granulosa cells	 a. Oosit b. Antrum c. Granulosa



d. Korpus Luteum

Korpus luteum merupakan kelenjar endokrin yang mensekresi progesterone dari folikel yang telah terovulasi. Korpus luteum berasal dari sel teka dan sel granulosa dari ovum yang terovulasi. Korpus hemoragik merupakan sisa folikel yang teralir dari arah hinggaberwarnamerah dengandipengaruhi hormon prolaktin (*Luteotropic hormone* / LTH) akan menjadi korpus luteum. Macam – macam korpus luteum ialah (Tomacdkk., 2011):

- Korpus luteum graviditatum merupakan korpus luteum yang berkembang dan beregresi pada siklus birahi
- Korpus luteum periodikum merupakan korpus luteum dari sekresi progesteron yang dipertahankan pada masa kebuntingan
- Korpus luteum persisten merupakan korpus luteum dari organ reproduksi karena adanya kelainan patologis.

2.7 Hormon

Hormon – hormon reproduksi betina diantaranya terdiri dari GnRH (*Gonadotrophin releasing hormon*), FSH (*Follicle stimulating hormon*), LH (*Luteinizing hormone*), serta hormon estrogen dan progesteron yang terdapat di ovarium (Norman dan Henry, 2015).

a. GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormon*)

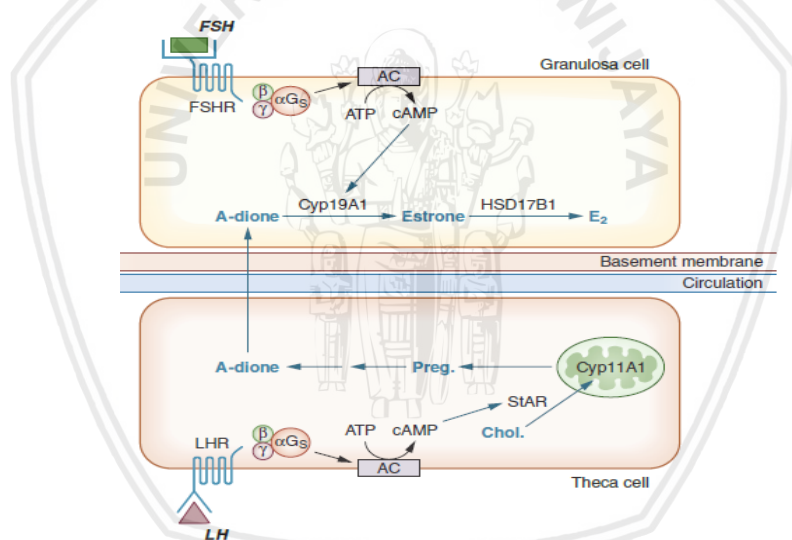
GnRH adalah hormon yang diproduksi oleh hipotalamus untuk merangsang hipofisa dalam menghasilkan hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormon*) dan LH (*Luteinizing hormone*). Hipotalamus mensekresi hormon GnRH melalui vena porta hipotalamo-hipofisa untuk disekresikan ke hipofisa anterior. Fungsi GnRH dari hipofisa anterior menstimulasi pengeluaran FSH dan LH sebagai respon estrogen atau progesteron (Kanasaki, 2017).

b. FSH dan LH

Menurut Nataraja dkk (2015), FSH (*Follicle Stimulating Hormon*) berperan dalam merangsang pertumbuhan folikel di ovarium dan mensekresi hormon estrogen. FSH yang berperan dalam sintesis estrogen akan berikatan dengan reseptornya di sel granulosa. FSHR (*Follicle Stimulating Hormon Receptor*) diaktifkan oleh ECD (*Extracellular Domain*) pada G-protein di TMD (*Transmembrane Domain*) menghasilkan cAMP sebagai media sinyal,

kemudian terjadinyatranskripsi di nukleus yang sebabkan dari PKA (*Protein Kinase-A*) untuk mengubah aromatase menjadi estradiol (**Gambar 2.11**).

LH (*Luteinizing hormone*) merangsang terjadinya ovulasi, LH membentuk korpus luteum dari folikel di ovarium. Korpus luteum yang terbentuk akan mensekresikan hormone progesteron (Rintafiani, 2014). Menurut Knobil dan Neils (2014), LHR (*Luteinizing Hormone Receptor*) memiliki ekstraseluler, helik, transmembran domain yang berpasangan dengan G – protein, sehingga LH bisa berikatan dengan LHR di sel teka,



kemudian akan melepaskan reseptor dan mengaktifkan cAMP sebagai media persinyalan (**Gambar 2.11**).

Gambar 2.11 Persinyalan FSH dan LH dengan reseptor (Norman dan Henry, 2015)

c. Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid yang disekresikan sel granulosa dan sel teka oleh folikel de Graaf. Fungsi estrogen yaitu merangsang terjadinya birahi, mempertahankan sistem saluran baring dan pertumbuhan baring. Penurunan kadar hormon estrogen dengan mensintesis FSH dan LH

makaterjadinya umpan balik positif, sedangkan peningkatan kadar hormon estrogen dengan menghentikan FSH dan sintesis LH yang terbentuknya umpan balik negatif (Campbell, 2010).

Menurut Norman dan Henry (2015), struktur estrogen merupakan yang paling potensial dengan jumlah banyak di dalam tubuh adalah estradiol $17\text{-}\beta$. Sintesis estrogen menggunakan kolesterol sebagai substrat untuk pembentukan estrogen. Kolesterol yang berada di luar membran mitokondria mengaktifkan StAR untuk mentransfer ke dalam membran mitokondria melalui P450_{scc} dipecah menjadi pregnenolon, pregnenolon diubah menjadi 17α -Hydroxy pregnenolon dan berlanjut membentuk *Dehydroepiandrosterone* (DHEA) dengan P450_{c17}, kemudian DHEA oleh 3β HSD2 diubah menjadi androstenediol, proses tersebut berlangsung di sel teka yang dibantu oleh LH. Tahap selanjutnya, FSH di sel granulosa berlangsung dari androstenediol dengan P450_{aromatase} membentuk estron dan terakhir dipecahkan 17β HSD1 menjadi estradiol 17β (**Gambar 2.12**).

d. Progesteron

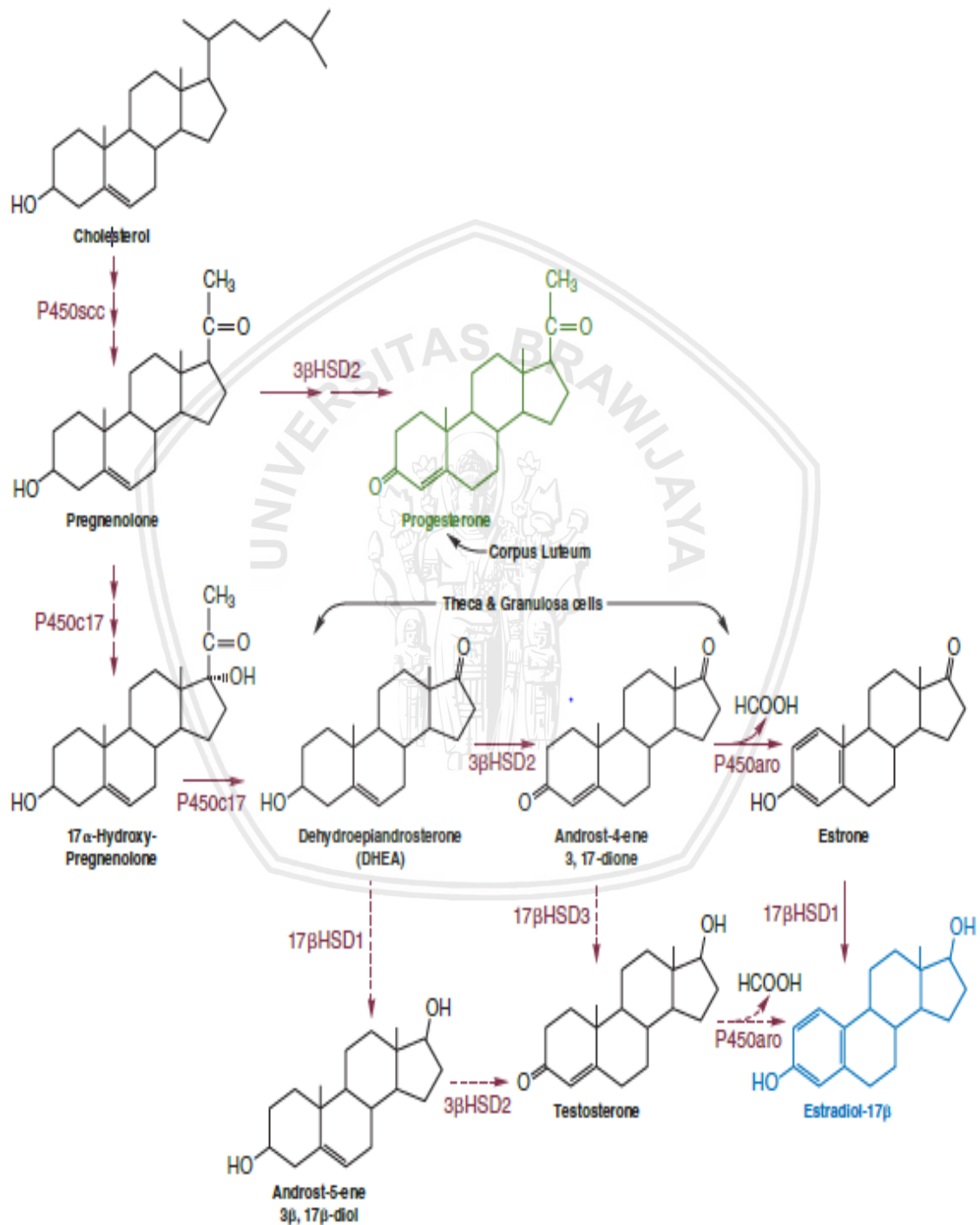
Progesteron diproduksi di tiga tempat yaitu setelah terjadinya ovulasi pada



korpus luteum, di folikel dalam jumlah sedikit, dan saat kebuntingan di plasenta.



Sintesis progesteron dari kolesterol yang dipecah menjadi pregnenolon oleh P450sc,



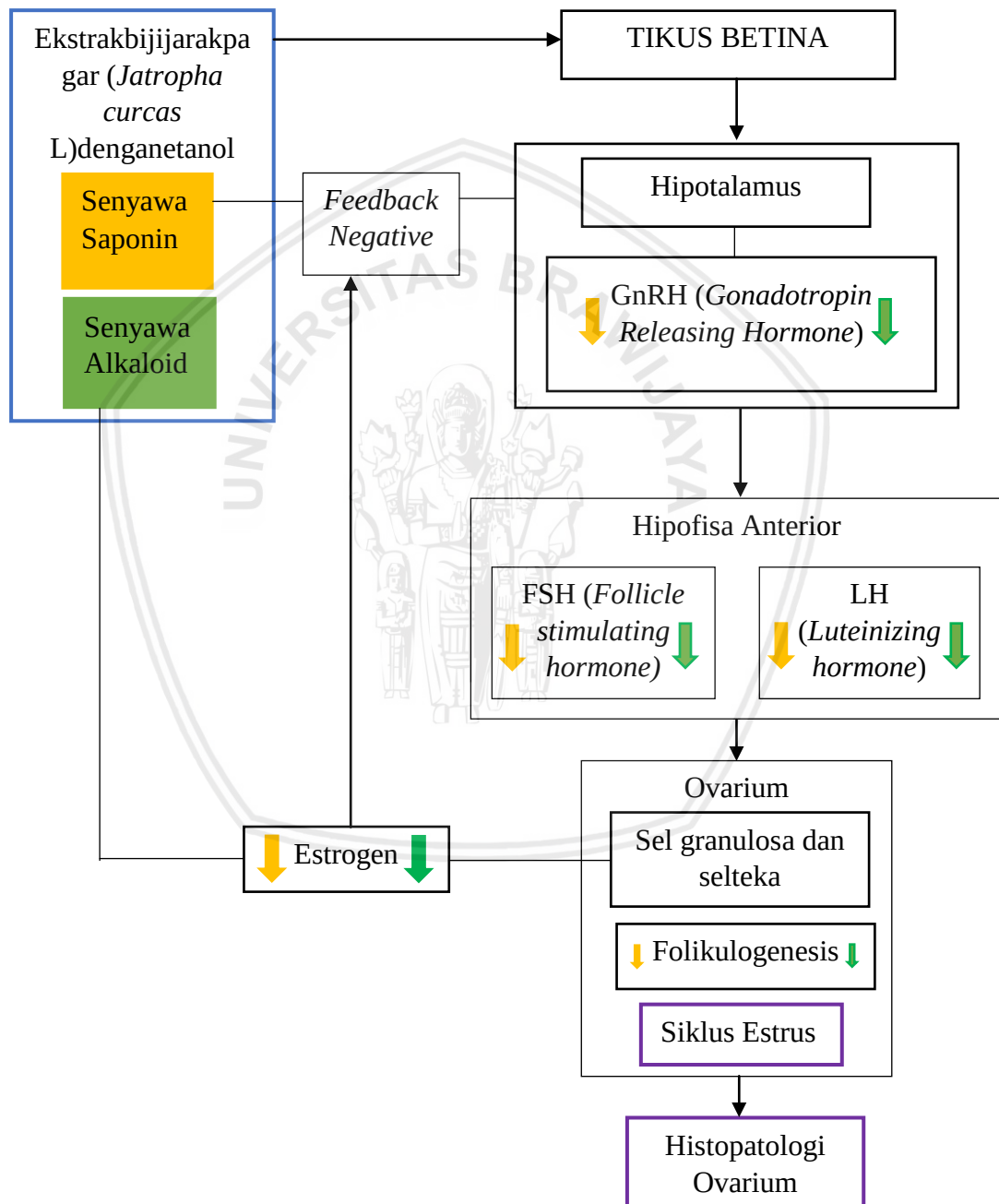
kemudian 3 β HSD2 mengubah pregnenolon menjadi progesteron (Norman dan Henry, 2015) (**Gambar 2.12**).

Gambar 2.12 Sintesis estrogen dan progesteron (Norman dan Henry, 2015)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

 : Variabel bebas

 : Senyawa saponin

 : Variabel terikat

 : Senyawa alkaloid

 : Penurunan reaksi saponin

 : Penurunan reaksi alkaloid

Siklus reproduksi pada hewan betina secara normal dipengaruhi oleh hipotalamus melalui kisspeptin yang berfungsi memberikan sinyal kepada neuron GnRH di median eminence dalam mensekresikan GnRH untuk dialirkan ke vena porta hipofisa menuju lobus hipofisa anterior (Skorupskaitedkk., 2014). Menurut Norman dan Henry (2015), hipofisa anterior pada bagian sel gonadotropin stimulus FSH dalam perkembangan folikel dan LH merangsang terjadinya ovulasi, serta FSH dan LH juga berperan pada proses sintesis steroid. LH berikatan dengan LHR melalui G-protein di sel untuk mengaktifkan cAMP, agar StAR mentransfer kolesterol ke outer membran mitokondria yang kemudian dipecahkan menjadi pregnenolon oleh P450_{scc}, melalui P450_{c17} diubah kembali menjadi 17 α Hydroxy pregnenolone dan Dehydroepiandrosteron (DHEA), terakhir 3 β HSD2 mengubah DHEA menjadi androstenediol. FSH berikatan dengan FSHR melalui G-protein di sel granulosa mengaktifkan cAMP merangsang P450 aromatase yang mengubah androstenediol menjadi estron, dilanjutkan oleh 17 β HSD1 menjadi 17 β -Estradiol. Esterogen selama fase folikel terus mengalami peningkatan hingga pada tahap akhir folikel mengalami *feedback positif* pada hipotalamus yang merangsang GnRH untuk mensintesis peningkatan FSH dan LH pada hipofisa anterior, inhibisi

β dari folikel pada hipofisa anterior menghambat sekresi FSH sehingga terjadi pelonjakan LH yang menyebabkan terjadinya ovulasi. Setelah terjadinya ovulasi, membentuk korpus luteum dan merangsang peningkatan inhibin α terhadap penurunan estrogen, sehingga terjadi *feedback negative* pada hipotalamus menghambat sekresi GnRH terhadap hipofisa anterior dalam sintesis FSH dan LH yang rendah. Korpus luteum juga menghasilkan peningkatan progesteron untuk mempersiapkan jika terjadi kehamilan, selanjutnya korpus luteum lisis menjadi korpus albicans dan terjadi penurunan inhibin α , sehingga estrogen meningkat memulai terjadinya siklus yang baru.

Ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan pelarutan etanol 70% menghasilkan senyawa saponin dan alkaloid sebagai anti-fertilitas. Senyawa saponin memiliki aktivitas estrogenik yang dapat meningkatkan estrogen dalam darah pada sel target (Rusmiati, 2010). Molekul saponin triterpenoid yang memiliki struktur kimia sama dengan estrogen dapat mengikat reseptor estrogen ($ER \beta$), setelah berikatan reseptor akan berpindah ke inti sel untuk berikatan dengan ERE (*Estrogen response element*), kompleks ikatan tersebut akan mengikat ko-aktivator untuk mengaktifkan faktor transkripsi yang dapat mengubah ekspresi gen (Mulyati, 2018). Saponin triterpenoid yang berikatan dengan $ER \beta$ menghasilkan *feedback negative* di hipotalamus menstimulus GnRH menekan hipofisa anterior dalam sintesis FSH dan LH, sehingga FSH dan LH mengalami penurunan yang mengganggu proses perkembangan dan pertumbuhan folikel. Senyawa alkaloid dapat mengurangi produksi estrogen

dengan menghambat aromatase tipe III pada proses sintesis esterogen. Penghambatan aromatase tipe III nonsteroid bersifat *reversible* dengan tidak mengaktifkan CYP19, menyebabkan tidak terjadi ekspresi pemecahan androsenediol menjadi estron untuk membentuk 17β -estradiol di sel granulosa (Linardi dkk., 2017).

Penurunan esterogen menghasilkan *feedback negative* untuk menghambat hipotalamus pada sekresi GnRH, sehingga hipofisis anterior mengalami penurunan dalam stimulasi FSH dan LH, mengakibatkan proses perkembangan dan pertumbuhan folikel menjadi terganggu yang dapat diamati melalui gambaran histopatologi pada ovarium (Yakubu dkk., 2008).

Siklus estrus hewan betina secara normal terdiri dari fase proestrus selama 12 jam yang ditandai perkembangan maksimum folikel, sehingga terjadi peningkatan esterogen, progesteron dan LH, serta terdapat sel parabasal dengan sel leukosit. Fase estrus folikel telah mengalami ovulasi yang berlangsung selama 12 jam dengan ciri khas adanya kornifikasi sel superfisial. Fase estrus pada esterogen dan LH mengalami penurunan, sedangkan progesteron perlahan menurun pada akhir fase estrus. Fase metestrus terjadi selama 21 jam, terdapat sel parabasal dengan penghambatan estrogen dan LH, serta mengalami sedikit peningkatan progesteron dari perkembangan korpus luteum. Fase diestrus merupakan fase terpanjang dari siklus estrus selama 60 jam, fase awal ditandai dengan sel parabasal dan fase pertengahan berkembang menjadi sel intermediet, pada fase diestrus

terjadi fungsional korpus luteum dan membentuk siklus baru, sehingga terjadi peningkatan estrogen dan LH, namun progesteron mengalami penurunan (Gal dkk., 2014).

Pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus yang menghambat sekresi GnRH dalam menstimulus hipofisis anterior untuk menghasilkan FSH dan LH yang rendah, sehingga fase proestrus mengalami penurunan FSH, LH, estrogen, dan progesteron yang mengakibatkan terhambatnya perkembangan maksimum dari pertumbuhan folikel, serta memperpanjang waktu untuk mencapai ovulasi.

Pencapaian ovulasi dari lamanya perkembangan maksimal folikel pada fase proestrus berupa pembentukan folikel de Graaf yang akan membentuk lonjakan LH untuk merangsang terjadinya ovulasi di fase estrus. Ovulasi akan berkembang menjadi korpus luteum pada fase metestrus, namun mengalami penurunan LH yang dapat memperlambat sintesis maksimal progesteron. Progesteron yang maksimal dari fase metestrus selanjutnya akan mengalami penurunan dalam jumlah yang banyak untuk membentuk siklus baru, sehingga terjadi perpanjangan fase diestrus. Siklus estrus tersebut, mempersingkat fase estrus pada betina yang menyebabkan waktu untuk kawin menjadi lebih singkat, sedangkan fase proestrus dan diestrus mengalami perpanjangan waktu dapat membuat betina tidak bersedia menerima pejantan dan mengakibatkan penundaan waktu kawin (Novrianti dkk., 2014).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah didapatkan hipotesis dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) memiliki kandungan senyawa saponin dan alkaloid menghasilkan *feedback negative* dapat menurunkan FSH dan LH yang berpengaruh terhadap siklus estrus dari ulas vagina terlihat perpanjangan fase metestrus dan menunda terjadinya siklus baru, sehingga tikus (*Rattus novergicus*) tidak mengalami masa birahi.
2. Pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan kandungan senyawa saponin dan alkaloid menghasilkan *feedback negative* dengan menurunkan sintesis FSH dan LH yang dapat mengganggu perkembangan folikel, sehingga folikel de Graaf mengalami penurunan. Penurunan folikel de Graaf mengakibatkan tidak terjadinya ovulasi dan tikus (*Rattus novergicus*) tidak memasuki masa birahi.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai laboratorium pemeliharaan tikus dan ulas vagina, laboratorium Materia Medika Batutempat pengekstraksian dan pembacaan senyawa ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L), laboratorium Kessima Malang sebagai tempat pembuatan preparat histopatologi ovarium. Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan April – Juni 2019.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, timbangan digital hewan, neraca analitik, blender, mortar, sonde, ayakan mesh 40, rotary evaporator, freezer dry, mikrotom, object glass, cover glass, mikroskop, seperangkat alat bedah, sondelambung, tabung sampel, paraffin block, rotary evaporator, oven, spidol permanen, kertas label, glove, masker, pipet tetes, dan cotton bud.

Bahan yang digunakan adalah tikus (*Rattus overgicus*) galur Wistar, biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L), pakan dan minum tikus, sekam, giemsa, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, freezer dry, kloroform, pereaksi pereaksi Dragendorff's, dan pereaksi Mayer's, NaCl 0,9 %, metanol I dan II, larutan formalin 10%, xylol I dan II, hematoxylin eosin, aquades.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan model yang digunakan berupa tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar, berjenis kelamin betina yang fertil, sudah pernah melahirkan, dan memiliki berat badan ± 200 g. Tikus didapatkan dari laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Menurut Kusningrum (2008), rumus perhitungan estimasi besar sampel sebagai berikut:

$$\text{Rumus : } t(n-1) \geq 15$$

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka pada 4 macam kelompok perlakuan diperlukan paling sedikit 5 kali ulangan dalam setiap kelompok perlakuan, sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara seragam atau homogeny dalam satuan percobaan. Penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok K (kontrol)

adalah kelompok tanpa diberi perlakuan, kelompok P1 merupakan kelompok tikus yang diterapi menggunakan ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan dosis 10mg/Kg BB, kelompok P2 diterapi dengan dosis 50mg/Kg BB, kelompok P3 diterapi dengan dosis 100 mg/Kg BB (**Tabel 4.1**). Pemberian terapi dilakukan secara peroral dua hari sekali pada setiap pagi selama 14 hari. Ulas vagina dilakukan dengan pewarna angiensa yang dilakukan sebelum hingga setelah perlakuan dan diulang setiap 4 hari sekali, sedangkan pemeriksaan folikel menggunakan preparat histopatologi ovarium dengan menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*).

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel Diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Siklus Estrus dan Histopatologi Ovarium					
Kelompok K (Kontrol) tanpa perlakuan					
Kelompok P1 terapi dosis 10 mg/Kg BB					
Kelompok P2 terapi dosis 50 mg/Kg BB					
Kelompok P3 terapi dosis 100 mg/Kg BB					

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini sebagai berikut :

Variabel bebas : Ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L)

Variabel terikat: Siklus estrus dan histopatologi ovarium

Variabel kontrol : Homogenitas tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar berdasarkan tikus yang fertil, berat badan, jenis kelamin, pakan, dan kondisi kandang.



4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan ialah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan jenis kelamin betina yang fertil dan pernah melahirkan, berat badan 200 gram. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Kandang tikus berukuran panjang 30 cm × 50 cm × 10 cm dengan setiap kandang berisi 3 ekor tikus, diberi sekam agar kandang tidak lembab, diletakkan bebas dari sinar bising dan terhindar dari polutan. Suhu optimum pada ruang tikus adalah 22 - 24°C dengan ventilasi yang cukup dan kelembapan 50 - 60%. Pemberian pakan dan minum tikus secara *ad libitum* secara teratur. Komposisi pakan yang diberikan mengandung protein 10%, karbohidrat, lemak 3%, vitamin, mineral dan air (AOAC, 2005).

4.6.2 Pembuatan Ekstraksi Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L)

Pembuatan ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan cara dingin dan menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Biji jarak pagar sebanyak 1,5 kg dikeringkan dengan kadar air 8,15% yang akan di blender hingga halus, kemudian dilakukan pengayakan menggunakan ayakan mesh 40 yang akan menghasilkan serbuk simplisia sebanyak 674 g yang akan disimpan pada tempat kering, tertutup rapat, dan terlindung cahaya.

Serbuksimplisia 674 g yang telahditimbangdilakukanmaserasimenggunakanpelarutetanol 70% sebanyak 5400 mL sampaisampelterendam. Proses maserasidilakukansecaraberulanghinggamenghasilkanmaseratberwarnapucatd enganwarna yang lebihbeningdarimaseratawal dan menggantikanpelarutetanol 70% setiap 3 harisekali. Hasil proses maserasidisaringuntukmendapatkanfiltrat. Total maserat yang didapatsebanyak 4350 mL yang kemudiandipectatkanmenggunakanrotary evaporator yang akanmenghasilkanekstraksebanyak 128,8437 g.

4.6.2.1 IdentifikasiGolongan Saponin

Identifikasigolongan saponin denganmenggunakan uji busaataubuihdengan ± 2 g material tumbuhandenganetanol 70% dimasukkedalamtabungreaksi yang ditambahkan 10 mL air, ditutup, dikocoksecarakuatselama 30 detik, dan didiamkan 30 menit. Interpretasihasilpositif saponin akanmembentukbusaataubuih yang lebihbesar 3 cm.

4.6.2.2 IdentifikasiGolongan Alkaloid

Identifikasigolongan alkaloid menggunakan uji *Culvernorfitzgerald*, 2-4 g material tumbuhan yang digerus, ditambahkan 10 mL kloroformamoniakal dan dihomogenkan. Dipisahkancampuranekstraksi yang disaringdengankainkasakedalamtabungreaksi, ditambahkan 0,5 mL asamsulfat, dikocok dan dibiarkanbeberapamenit.

Dipisahkan lapisan jernih bagian atas untuk dimasukkan ke dalam dua tabung reaksi berukuran kecil, tabung pertama diberikan pereaksi *Dragendorff's*, sedangkan tabung kedua diberikan pereaksi *Mayer's* sebanyak 2 – 3 tetes. Interpretasi hasil positif alkaloid pada pereaksi *Dragendorff's* terbentuk endapan kuning jingga atau oranye, dan pereaksi *Mayer's* dengan endapan putih.

4.6.3 Pemberian Perlakuan kepada Tikus

Tikus (*Rattus novergicus*) galur Wistar berjenis kelamin betina dibagi menjadi 4 kelompok yaitu K (Kontrol) tanpa diberikan perlakuan ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L), kelompok P1 diberikan perlakuan ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan dosis 10 mg/Kg BB, kelompok P2 diberikan perlakuan ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan dosis 50 mg/Kg BB, dan kelompok P3 diberikan perlakuan ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dengan dosis 100 mg/Kg BB.

4.6.4 Ulas vagina

Pembuatan preparat ulas vagina pada tikus (*Rattus novergicus*) menggunakan *cotton buds* yang telah dibasahi larutan NaCl 0,9 % dimasukkan ke dalam vagina dengan gerakan memutar ke arah punggung, kemudian di apus di atas *object glass*. *Object glass* yang telah diulas dikeringkan, kemudian dimasukkan ke dalam metanol selama 5 menit, setelahnya dilakukan pewarnaan dengan larutan giemsa selama 20 menit.

Preparat yang telah terwarnai dicuci menggunakan *aquadest* dan dikeringkan untuk dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 4×10 (Popalayahdkk., 2013).

4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat dimulai dari euthanasia tikus dengan cara dislokasi leher dan nekropsis tikus di setiap kelompok sebelum didapatkan isolasi organ ovarium. Organ ovarium kemudian dicuci menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% untuk menghilangkan sisa darah yang menempel dan disimpan pada formalin 10% agar tidak terjadi pembusukan sehingga organ tetap awet. Menurut Jungquiera and Carneiro (2007), proses pembuatan preparat histologi dimulai dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin, *sectioning*, *embedding*, serta pewarnaan menggunakan *Hematoxylin Eosin* (HE).

Fiksasi merupakan langkah pertama dari pembuatan preparat histologi dengan cara perendaman organ ovarium ke dalam larutan formalin 10%, kemudian dilakukan dehidrasi dengan merendam ke dalam larutan bertingkat pada etanol 70% minimal 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% dan etanol absolut masing – masing 20 menit. Penjernihan (*clearing*) dilakukan dengan memindahkan etanol absolut ke dalam larutan penjernihan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit yang kemudian diinkubasi suhu 56-58°C dan direndam sebanyak 3 kali ke dalam xylol.

Infiltrasi dilakukan dengan meletakkan jaringan ke dalam cairan parafin panas dan ditunggu hingga ovarium melekat pada parafin blok. *Sectioning* dilakukan dengan meletakkan parafin blok berisi ovarium ke penjepit mikrotom. Ovarium diiris berukuran 5 μm dan dipindahkannya ke dalam air hangat 38 – 40°C agar tidak terjadi kerutan halus pada preparat. *Embedding* dengan melekatkan preparat pada gelas objek dan dikeringkan, preparat disimpan dalam inkubasi 38 – 40°C dan siap untuk dilakukan pewarnaan HE.

4.6.6 Pewarnaan Menggunakan Hematoxylin Eosin (HE)

Pewarnaan preparat ovarium menggunakan Hematoxylin Eosin (HE) dengan zat pewarna hematoxylin pada inti sel akan berwarna biru, sedangkan eosin pada sitoplasma sel akan berwarna merah muda. Tahap pewarnaan diawali dengan deparafinisasi preparat menggunakan xylol bertingkat selama 5 menit, dilanjutkan tahap dehidrasi preparat masing – masing selama 5 menit pada etanol absolut, etanol 95%, 90%, 80%, 70%, kemudian direndam preparat selama 5 menit dalam aquades.

Preparat dimasukkan selama 10 menit dalam zat pewarna hematoxylin, dicuci dengan air mengalir secara perlahan, dan dibilas menggunakan aquades, selanjutnya preparat dimasukkan selama 10 menit dalam eosin alkohol. Tahap dehidrasi dengan memasukkan preparat ke etanol secara bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, dan etanol absolut. Tahap *clearing* preparat dimasukkan ke dalam xylol, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

Tahap *mounting* dilakukan penempelan preparat dan ditutup menggunakan *cover glass*. Preparat kemudian diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400 kali untuk melihat bagian folikel ovarium.

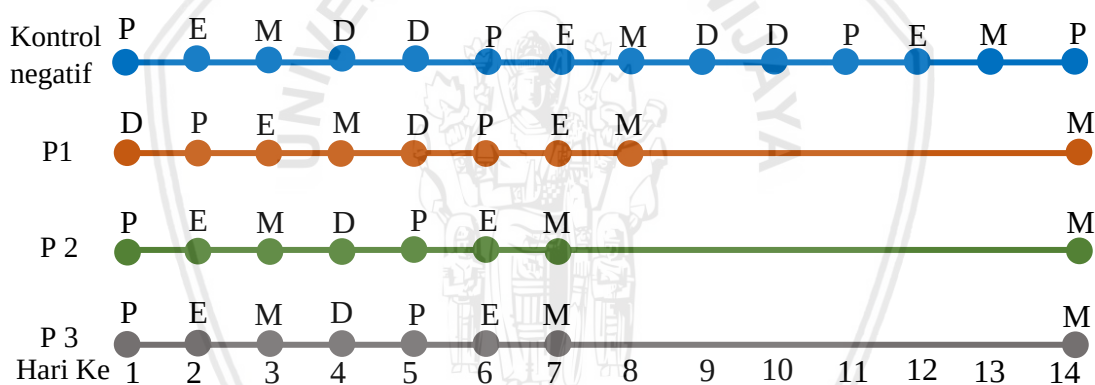
4.7 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini berupa kualitatif dan kuantitatif. Siklus estrus dianalisis secara kualitatif dengan melihat perpanjangan siklus estrus berupa fase metestrus, sedangkan hitungan patologi folikel de Graaf ovarium dianalisis secara kuantitatif pada rata – rata jumlah folikel de Graaf menggunakan uji *One way Analysis of Variance* (ANOVA), jika terjadi perbedaan dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Duncan Multiple New Range Test* (DMNRT) dengan taraf keberhasilan 95% ($\alpha = 0,05$).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Siklus Estrus pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Hasil penelitian dari pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap pulas vagina pada tikus (*Rattus novergicus*) menunjukkan siklus estrus yang terdiri dari fase proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus.



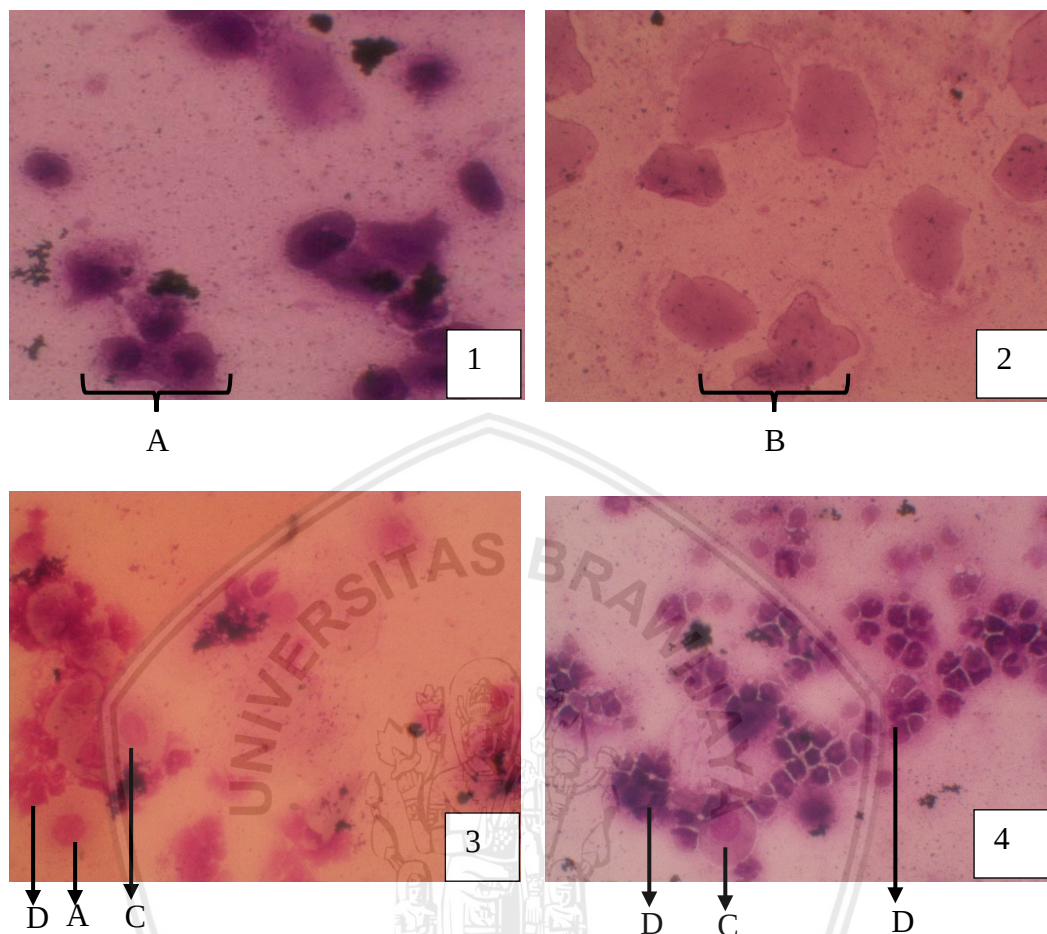
Gambar 5.1 Siklus estrus tikus (*Rattus novergicus*) selama 14 hari
Keterangan: proestrus (P), estrus (E), metestrus (M), dan diestrus (D)

Kontrol (-) :

P1 (10 mg/Kg BB) :

P2 (50 mg/Kg BB) :

P3 (100 mg/Kg BB) :



Gambar 5.2 Ulas vagina pada tikus (*Rattus novergicus*) dengan pewarnaan giemsa pada fase proestrus (1), fase estrus (2), fase metestrus (3), dan fase diestrus (4), perbesaran 400x

Keterangan: sel parabasal (A), selkornifikasi (B), selintermediet (C), leukosit (D)

Siklus estrus dari pengamatan hasil ulas vagina berlangsung selama 14 hari. Kontrol negatif memiliki siklus estrus teratur setiap siklus terjadi selama 5 hari yang terdiri dari fase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus. Kelompok P1 yang diberi ekstrak sibi jirak pagar (*Jatropha curcas* L) pada dosis 10 mg/kg BB dalam siklus estrus selama 5 hari mengalami fase yang teratur dari fase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus, namun pada siklus kedua atau hari ke-8 terdapat perpanjangan fase metestrus hingga terakhir pemberian perlakuan hari ke-14,

sehinggamenundauntukterjadinyasiklusbaru. Kelompok P2 yang diberiekstraksibijijarakpagar (*Jatropha curcas* L) pada dosis 50 mg/kg BB dalamsatusiklus estrus selama 5 harimengalamifase yang teraturdarifase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus, namun pada sikluskeduaatau harike 7 terdapatperpanjanganfase metestrus hinggaterakhirpemberianperlakuanhari ke-14, sehinggamenundauntukterjadinyasiklusbaru. Kelompok P3 yang diberiekstraksibijijarakpagar (*Jatropha curcas* L) pada dosis 100 mg/kg BBsamasepertikelompok P2 dosis 50 mg/kg BBdalamsatusiklus estrus selama 5 harimengalamifase yang teraturdarifase proestrus, fase estrus, fase metestrus dan fase diestrus, namun pada sikluskeduaatau harike 7 terdapatperpanjanganfase metestrus hinggaterakhirpemberianperlakuanhari ke-14, sehinggamenundauntukterjadinyasiklusbaru (**Gambar 5.1**).

Kelompok P1, P2, dan P3 dengan masing – masing pemberian ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dosis 10 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB memiliki perbedaan terhadap kontrol negatif pada siklus kedua atau harike 8 pada kelompok P1 dan kelompok P2 harike 7 terdapat perpanjangan fase metestrus hingga harike 14 terakhir pemberian ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L). Perpanjangan fase metestrus menyebabkan memperlama untuk memasuki fase diestrus, sehinggamenunda terjadinyasiklusbaru.

Kelompok kontrol negatif menunjukkan terjadinyasiklus estrus yang normal berlangsung selama 5 hari yang terdiri dari fase proestrus, fase estrus, fase metestrus, dan fase diestrus. Fase proestrus terdapat sel parabasal yang

terjadiselama 12 jam (Gal dkk., 2014). Fase proestrus mengalami peningkatan estrogen sehingga terjadi *feedback positive* pada hipotalamus yang menstimulus GnRH terhadap peningkatan sintesis FSH dan LH oleh hipofisa anterior untuk pertumbuhan dan perkembangan folikel. Fase estrus terdapat sel superfisial dengan kornifikasi yang berlangsung selama 12 jam (Gal dkk., 2014). Fase estrus terjadi setelah akhir fase proestrus membentuk folikel dominan yang siap diovolusi dengan menghasilkan inhibin- β terhadap hipofisa anterior menghambat terjadinya sintesis FSH, sehingga terbentuk lonjakan LH untuk terjadinya ovulasi yang akan dilanjutkan membentuk korpus hemorrhagikum. Fase metestrus berlangsung selama 21 jam setelah fase estrus dengan membentuk korpus luteum yang ditandai dengan sel parabasal dan terdapat leukosit (Srinivasan dkk., 2017). Fase metestrus mengalami peningkatan hormon progesteron dan penurunan estrogen yang disebabkan oleh peningkatan inhibin- α , sehingga terjadi *feedback negative* pada hipotalamus dalam menstimulus GnRH terhadap hipofisa anterior yang menurunkan sintesis FSH dan LH. Fase diestrus berlangsung selama 60 jam yang terdapat sel intermediet dan leukosit yang mendominasi (Gal dkk., 2014). Fase diestrus mengalami penurunan progesteron dan mulai terjadi peningkatan estrogen untuk memulai siklus reproduksi baru (**Gambar 5.2**).

Kelompok P1 dengan dosis ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) 10 mg/kg BB mengalami fase teratur pada siklus pertama selama 5 hari, memasuki siklus kedua atau hari ke-8 terjadi perpanjangan fase metestrus

hinggaterakhirpemberianesktraksibijijarakpagar (*Jatropha curcas* L) hari ke-14. Kelompok P2 dan kelompok P3 dengandosisesktraksibijijarakpagar (*Jatropha curcas* L) 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB mengalami faseteratur pada sikluspertamaselama 5 hari, memasukisikluskeduaatau hari ke-7 terjadi perpanjangan fase metestrus hinggaterakhirpemberianesktraksibijijarakpagar (*Jatropha curcas* L) hari ke-14, sehinggamenundaterjadinyasiklusbaru. Hal ini disebabkan oleh kandungan saponin dan alkaloid dari ekstrak sibiijarakpagar (*Jatropha curcas* L) yang menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus dengan menghambat stimulus GnRH terhadap hipofisa anterior dalam mensintesis FSH dan LH yang mengakibatkan terganggunya perkembangan folikel untuk membentuk folikel dominan yang siap diovolusi pada fase proestrus. Penurunan FSH dan LH menyebabkan tidak terbentuknya proliferasi epitel berinti vagina berupa sel parabasal, sehingga pada pemberian ekstrak sibiijarakpagar (*Jatropha curcas* L) tidak ditemukan sel parabasal yang menandakan terjadinya penundaan terbentuknya siklus baru untuk memasuki fase proestrus.

Fase

estrus

terjadi setelah fase proestrus, ketika terbentuknya folikel dominan yang siap diovolusi akan menghasilkan kadar estrogen tinggi dan melepaskan inhibin- β pada hipofisa anterior menghambat FSH, sehingga terjadi lonjakan LH untuk terjadi ovulasi pada fase estrus. Kadar estrogen yang tinggi membuat sel berproliferasi dengan membentuk katankompleks estrogen –

reseptor didalam sitosol akan berdifusi ke inti sel dan melekat pada DNA untuk sintesis protein sebagai ekspresi dari mRNA yang menjadikan aktivasi sel meningkat dan bertumpuk menjauh pembuluh darah dapat mengurangi nutrisi sel membuat inti sel menjadi piknotik dan hilang membentuk kornifikasi, ketika dilakukan pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus dengan menghambat stimulus GnRH terhadap hipofisa anterior dalam mensintesis FSH dan LH pada kadar yang rendah mengakibatkan tidak terjadinya ovulasi dan tidak ditemukan kornifikasi pada hasil ulas vagina yang menandakan terjadinya penundaan terbentuknya siklus baru untuk memasuki fase estrus.

Fase metestrus terbentuk setelah fase estrus dengan membentuk korpus luteum. Korpus luteum menghasilkan progesteron, leukosit, dan merangsang pelepasan inhibin- α yang dapat menurunkan estrogen menyebabkan terjadinya *feedback negative* pada hipotalamus menghambat stimulus GnRH terhadap hipofisa anterior dalam mensintesis FSH dan LH yang berperan agar tidak terjadi perkembangan folikel. Pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus dengan menghambat stimulus GnRH terhadap hipofisa anterior untuk mensintesis FSH dan LH pada kadar yang rendah, sehingga rendahnya estrogen dan tingginya progesteron mengakibatkan korpus luteum dipertahankan dalam waktu lama yang menyebabkan terjadinya perpanjangan siklus

estrus. Pengaruh pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) juga membuat jumlah folikel de Graaf mengalami penurunan, sehingga tidak terjadinya ovulasi dan tidak memasuki masa birahi, serta penurunan jumlah folikel de Graaf yang mengalami atresia membuat *dibutyryl cyclic ATP* mengeluarkan signal untuk menstimulasi produksi progesteron. Produksi progesteron yang tinggi dan rendahnya esterogen dapat mempertahankan fase metestrus dan menunda memasuki fase diestrus hingga kadar progesteron menurun, serta kembali meningkatnya estrogen agar dapat terbentuk siklus baru.

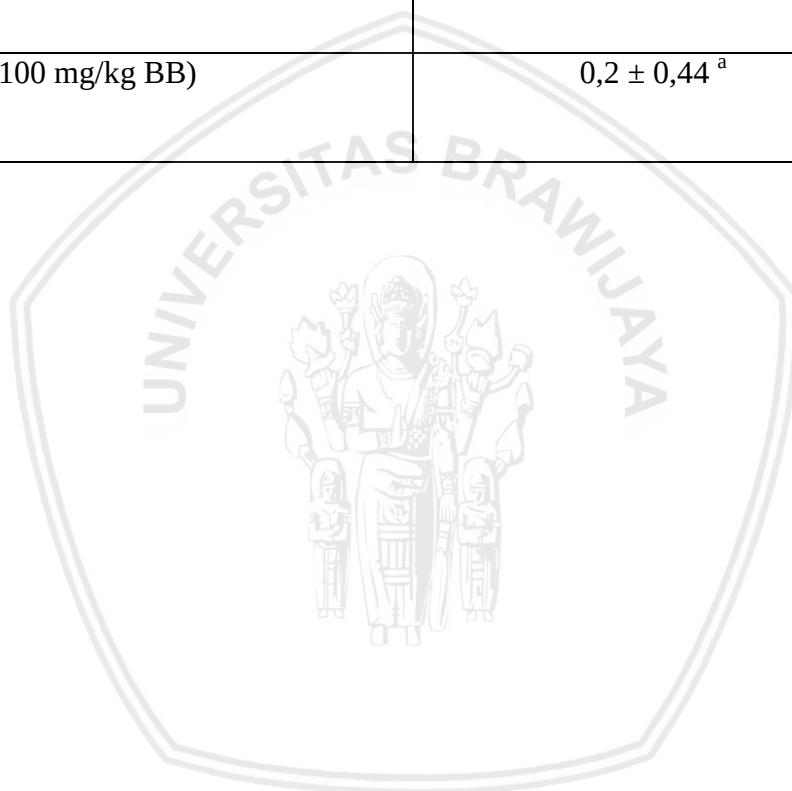
Pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) disimpulkan dapat memperpanjang siklus estrus dengan memperlambat terjadinya fase metestrus dan menunda terbentuknya siklus baru yang menyebabkan tikus (*Rattus novergicus*) mengalami penundaan masa birahi, sehingga ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat dijadikan sebagai kontrasepsi alami.

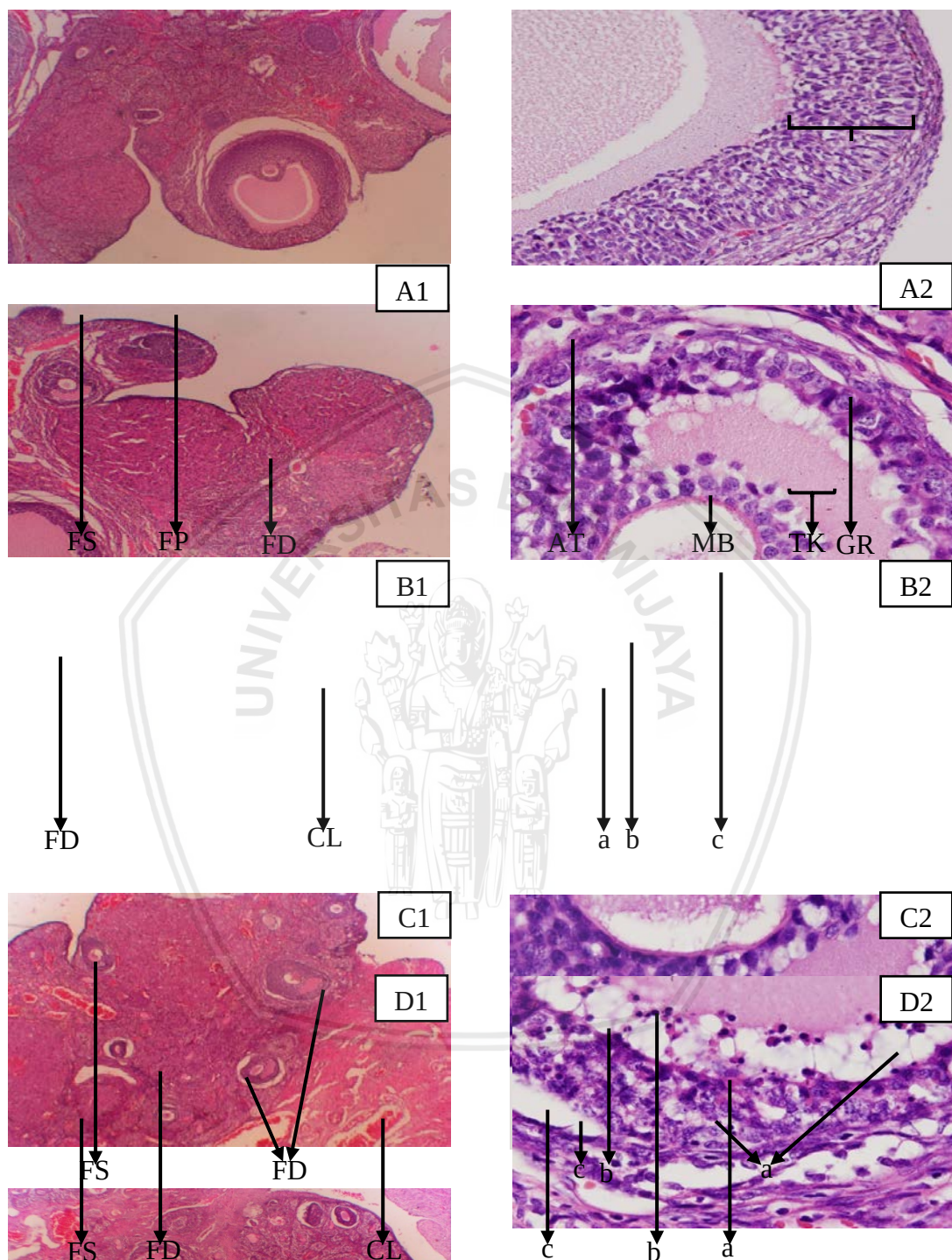
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) sebagai Kontrasepsi Betina dengan Melihat Jumlah Folikel de Graaf pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Hasil penelitian dari pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap jumlah folikel de Graaf melalui histopatologi ovarium dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) pada tikus (*Rattus novergicus*) menunjukkan penurunan jumlah folikel de Graaf.

Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Folikel de Graaf pada Tikus (*Rattus novergicus*)

Kelompok	Rata-Rata Jumlah Folikel de Graaf $\pm$ SD
Kontrol Negatif	$7,2 \pm 0,83^c$
P1 (10 mg/kg BB)	$1,6 \pm 1,51^b$
P2 (50 mg/kg BB)	$0,8 \pm 0,83^{ab}$
P3 (100 mg/kg BB)	$0,2 \pm 0,44^a$





Gambar 5.3 Histopatologifolikel de Graaf tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) pada kelompok kontrol negatif (A), P1 (10 mg/kg BB) (B), P2 (50 mg/kg BB) (C), P3 (100 mg/kg BB) (D), perbesaran 40x (1) dan 1000x (2)

Keterangan : antrum (AT), granulosa (GL), sel teka (TK), membran basal (MB), folikel primer (FP), folikelsekunder (FS), folikel de Graaf (FD), corpus luteum (CL)

(a) pelonggaran, peluruhan, dan disorganisasi sel granulosa; piknotik sel granulosa dan oosit (b); sel granulosa lepas dari membran basal (c)

Kelompok yang memiliki nilai rata – rata jumlah folikel de Graaf tertinggi, yaitu kelompok kontrol negatif sebesar $7,2 \pm 0,83$. Kelompok P1 (10 mg/kg BB) dengan rata – rata jumlah folikel de Graaf sebesar $1,6 \pm 1,51$. Hasil pada kelompok P1 (10 mg/kg BB) mengalami penurunan jumlah folikel de Graaf, menunjukkan bahwa rata – rata jumlah folikel de Graaf berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok P2 (50 mg/kg BB) memiliki rata – rata jumlah folikel de Graaf sebesar $0,8 \pm 0,83$ terhadap kontrol negatif $7,2 \pm 0,83$ mengalami penurunan jumlah folikel de Graaf yang menunjukkan bahwa rata – rata jumlah folikel de Graaf berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok P3 (100 mg/kg BB) memiliki rata – rata jumlah folikel de Graaf sebesar $0,2 \pm 0,44$ dibanding dengan kontrol negatif, menunjukkan bahwa rata – rata jumlah folikel de Graaf berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (**Tabel 5.1**).

Kelompok kontrol negatif memiliki gambaran normal dari folikel de Graaf yang terdiri dari sel teka interna, sel teka eksterna, membran basal, sel granulosa, antrum, *cumulus oophorus*, *zona pellucida*, dan oosit. Menurut Rosadi dkk. (2011), menyatakan bahwa morfologi folikel normal terlihat oosit berbentuk utuh, inti sel bulat, sel granulosa terorganisir baik tanpa ada inti piknotik. Perkembangan folikel dipengaruhi oleh produksi FSH dan LH untuk proliferasi sel granulosa pada folikel primer membentuk kumparan yang terdiri dari beberapa lapisan menjadi sel teka. Sel granulosa membentuk antrum dengan mensekresi dan mengumpulkan cairan folikuler yang memiliki tinggi kandungan estrogen, sehingga sel granulosa dan

sel tekamengalamipercepatanproliferasi dan sekresi yang membuatfolikel tumbuhmenjadifolikel antral (**Gambar 5.3**).

Kelompok P1 (10 mg/kg BB), P2 (50 mg/kg BB), P3 (100 mg/kg BB) secara keseluruhnengalamipenurunan rata – rata jumlahfolikel de Graaf sebesar $1,6 \pm 1,51$, $0,8 \pm 0,83$, dan $0,2 \pm 0,44$. Dilihatsecarapengamatanhistopatologifolikel de Graaf mengalamipelonggaran dan peluruhan sel granulosa, disorganisasi sel granulosa, inti pikotik pada sel granulosa dan oosit, serta terpisah antara membran granulosa dengan membran basal. MenurutSasan dkk. (2016), menyatakan bahwa folikel antral yang mengalami atresi dikategorikan menjadi obliteratif dan kistik. Obliteratif dibagi menjadi dua yaitu derajat I terdapat inti piknotik di membran granulosa dekat antrum atau di antrum, akan tetapi didekat laminal basal sehat dan padat, serta lapisan sel granulosa terlepas dari dasarnya, sedangkan derajat II pada membran granulosa dipisahkan satu dengan lainnya oleh ruang antar sel. Kistik ditandai atrofi pada sel granulosa dan sel teka, penurunan ukuran folikel dan antrum, sel granulosa hanya terdiri 1 – 2 lapisan.

Kandungan saponin dan alkaloid pada ekstrakbibijarakpagar (*Jatropha curcas* L)dalamgambaranhistopatologimenyebabkansel granulosa menjadipiknotik. Piknotiksel granulosa dikarenakan saponin memilikistruktur triterpenoid bersifatesterogenik yang dapatmeningkatkanestrogendidalamdarahdenganberikatan pada reseptor estrogen (ER- β),sehinggaterjadi*feedback negative* pada hipotalamusmenghambat stimulus GnRH pada hipofisa anterior untukmensintesis FSH dan LH (Mulyati, 2018).

Senyawa alkaloid dapat menghambat aromatase tipe III yang bersifat *reversible* dengan tidak mengaktifkan CYP19 yang menyebabkan androstenediol tidak dapat memecahkan estron, sehingga estron melalui enzim 17β HSD1 tidak membentuk estrogen di sel granulosa (Linardi dkk., 2017). Tidak terbentuknya estrogen mengakibatkan terjadinya penurunan estrogen yang menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus menghambat stimulus GnRH terhadap hipofisa anterior dalam mensintesis FSH dan LH (Yakubu dkk., 2008).

Penurunan FSH dan LH dari kandungan saponin dan alkaloid ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) menghasilkan ATP rendah dari aktivasi pompa Na^+ dan K^+ ATPase yang disebabkan oleh akumulasi Ca^{2+} berupa penurunan Na^+ dan Ca^{2+} ATPase. Rendah ATP mengakibatkan kebocoran pada permeabilitas membran sel, sehingga terjadi piknotik pada sel granulosa. Piknotik mengakibatkan sel granulosa tidak dapat berproliferasi untuk membentuk sel teka dan antrum yang mengganggu pertumbuhan dan perkembangan folikel. Menurut Celestino dkk. (2009), menyatakan bahwa sel mengalami nekrosis terlihat pemblokiran kromatin, pembengkakan dan degenerasi seluruh sitoplasma dan matriks mitokondria akibat masuknya Na^+ dan air, serta pelepasan sitoplasma ke dalam ruang ekstraseluler.

Berdasarkan hal tersebut,

dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) semakin tinggi dosis maka semakin besar penurunan jumlah folikel de Graaf. Penurunan jumlah folikel de Graaf dikarenakan kandungan saponin dan alkaloid

pada ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) menghambat sintesis FSH dan LH yang menyebabkan terbentuknya folikel atresia pada tahap perkembangan folikel, sehingga terjadi penurunan jumlah folikel de Graaf. Jumlah folikel de Graaf yang menurun menandakan terjadinya perpanjangan siklus estrus yang dapat digunakan sebagai kontrasepsi alami.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) selama 14 hari dengan dosis 10 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB mampu menyebabkan siklus estrus pada fase metestrus tikus (*Rattus novergicus*) menjadi lebih panjang
2. Pemberian ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) selama 14 hari dengan dosis 10 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB secara histopatologi folikel de Graaf terlihat pelonggaran dan peluruhan sel granulosa, piknotik sel granulosa dan oosit, serta sel granulosa lepas dari membran basal yang dapat membuat folikel menjadi atresia, sehingga mampu menurunkan jumlah folikel de Graaf pada tikus (*Rattus novergicus*).

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperlukan adanya penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap kadar hormon estrogen dan progesteron, seberapa besar pengaruh dari ekstrak sibi jarak pagar (*Jatropha curcas* L) setelah 14 hari tetap diberikan / tidak diberikan perlakuan, mengetahui reversible atau irreversible, serta mengetahui dari

senyawa saponin dan alkaloid pada ekstrak biji jarak pagar (*Jatropha curcas* L) dapat menurunkan kadar estrogen yang berpengaruh terjadinya *feedback negative* pada hipotalamus.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdulghani, M. 2016. Modified Vaginal Sampling Technique Reduces Interference on Estrous Cycle's Phases of Rats. *ARRB*, 9(4) : 1-5.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Adabia Press. Jakarta. 1-14.
- Aksara, R., W.J.A. Musa dan L. Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). *Jurnal Enteropi*, 3(1) : 514-518.
- Alfian, M.A.J., A.J. Sitasiswi, dan M.A. Djaelani. 2018. Efek Antifertilitas Ekstrak Air Biji Pepaya (*Carica papaya* L) Terhadap Jumlah dan Diameter Folikel de Graaf Mencit (*Mus musculus*) Betina. *Jurnal Pro-Life*, 5(1) : 477-484.
- Arini, W.D. 2012. *Uji Antifertilitas Ekstrak Etanol 70% Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L) pada Tikus Jantan Galur Sprague Dawley secara In Vivo* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Association of Analytical Community (AOAC). 2005. Officials Methods of AOAC International. Arlington VA. USA. Vol 2.
- Batubara, M.S., E. Sabri, dan M. Tanjung. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) Terhadap Gambaran Morfologi Ovarium Mencit (*Mus musculus* L.) Strain DDW. *Klorofil*, 1(1) : 5-10.
- Bloom and Fawcett. 1994. *A Textbook of Histology Ed 12th*. Jakarta, 731-732.
- Borges, P, Fontbonne, and R.P. Carreira. 2015. New Approaches for Hormonal Contraception in Female Cats. *CECAV Animal and Veterinary Research Center*, 1-20.
- Briggs J. 2013. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. *Alliance for Contraception in Cat and Dogs (ACC&D)*, 23-42.
- Bulun, S.E., and E.Y. Adhasi. 2001. *The Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis*. In Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonsky, Williams *Textbook of Endocrinology*. 10th Ed. Saunders. Philadelphia : 587-608.
- Campbell, A.N., J.B. Reece, L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman., P.V. Minorsky, dan R.B. Jackson. 2010. *Biologi Campbell Edisi 8 Jilid III*. Jakarta: Erlangga.

- Campbell, A.N., J.B. Reece, dan L.G. Mitchell. 2004. *Biologi Edisi Kelima*. Jakarta: Erlangga.
- Celestino, J.J.H., R.N. Chaves, M.H.T. Matos, M.V.A. Saraiva, J.B. Bruno, J.E.Bruno, J.E.M. Junior, J.R.V. Silva, J.R. Figueirido. 2009. Mechanism of Atresia in Ovarian Follicles. *Anim Reprod*. 6(4): 495 – 508.
- Coccia M.E, C. Comparetto, G.L. Bracco, G. Scarselli. 2004. GnRH Antagonists. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biologi*, 115 : 44-56.
- Cynthia, X.M., T. Reinert, I. Chmielewska, and M.J. Ellis. 2015. Mechanisms of Aromatase Inhibitor Resistance. *Macmillan Publisher Limited*, 261-262.
- Desai, S.P., D.G. Desai, H. Kaur. 2009. Saponin and Their Biological Activites. *Pharma Times*, 41(3) : 13-15.
- Diaz, A.D.L.A.A., and E.H. Roudriguez. 2010. *Revisiones En Biologia Celular Y Molecular*. Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua. Bilbao.
- Gal, A., L. Poching, A.M. Barger, A.L. Macneill, and K. Chemyong. 2014. Vaginal Fold Histology Reduces the Variability Introduced by Vaginal Exfoliative Cytology in the Classification of Mouse Estrous Cycle Stages. *Toxicologic Pathology*, 20(10) : 1-8.
- Gartner, L.P., and J.L. Hiatt. 2001. *Color Textbook of Histology*. WB Saunders Company. 20 : 461-469.
- Gedoan, S.P., A. Hartana., Hamim, U. Widyastuti, dan N. Sukarno. 2013. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, 3(1) : 10-16.
- Goldman, J.M., A.S. Murr, and R.L. Cooper. 2007. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research*, 80 : 84-97.
- Goswami, P., A. Hazarika, dan H.N. Sarma. 2008. Thin Layer Chromatographic Fraction of Root Extraxt of *Polygoum hydropiper* Induces Vaginal Epithelial Cell Maturation in Adult Ovariectomized Albino Rat. *Journal Endocrinol Reproduction* 12. 1: 39-46.
- Gudeta, T.B. 2016. Chemical Composition Biodisel Potential and Uses of *Jatropha curcas* L (*Euphorbaceae*). *American Journal of Agriculture and Forestry*, 4(2) : 35-48.
- Hamid, H.Y., and M.Z.A.B. Zakaria. 2013. Reproductive Characteristics of the Female Laboratory Rat. *African Journal of Biotechnology*, 12(19) : 2510-2514.

- Hariadi M., S. Hardjopranyoto, Wurlina, H.A. Hermadi, B. Utomo, Rimayanti, I.N. Triana, H. Ratnani. 2011. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. 62-63.
- Harimurti, N., dan D. Sumangat. 2011. Pengelolaan Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Menjadi Sumber Bahan Bakar Nabati dan Pemanfaatan Produk Samping. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*, 7(1) : 49-53.
- Hartanto, H. 2003. *Keluarga Berencana dan Kontrasepsi*. Jakarta : Pustaka Sinar Harapan.
- Hubscher, C.H., D.L. Brooks, J.R. Johnson. 2005. A Quantitative Method for Assessing Stages of the Rat Estrous Cycle. *Taylor and Francis*, 80(2) : 79-87.
- Jungquiera, L.C. and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology Text and Atlas*. McGraw-Hill Education. New York City. US.
- Kartika, A.A., H.C.H. Siregar, dan A.M. Fuah. 2013. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Tikus (*Rattus novergicus*) dan Mencit (*Mus musculus*) di Fakultas Peternakan IPB. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Pertanian*, 1(3) : 147-154.
- Kanasaki, H., Oride, A. Mjjidori, T. Sukhbaatar, dan U. Kyo. 2017. How is GnRH Regulated in GnRH Production Neurons Studies Using GT1-7 Cell as a GnRH Production Cell Model. *Gen Com Endrocinol*, 247: 138-142.
- Kappeler, C.J., and P.B. Hoyer. 2012. 4-Vinylcyclohexene Diepoxide: A Model Chemical for Ovotoxicity. *Syst Biol Preprod Med*. 58(1) : 57-62.
- Knobil dan Neills. 2014. *Physiology of Reproduction*. 4th Ed. Academic Press is an Imprint of Elsevier. America, 1: 77.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 53-92.
- Laxane, S.N., S. Swarnkar, K. Mruthunjaya, S.B. Zanwar, dan S.M. Manjunath. 2013. *Jatropha curcas*: A Systemic Review on Pharmacological, Phytochemical, Toxicological Profiles, and Commercial Applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Sciences*, 4(1) : 989-1007.
- Linardi, A., D. Damiani, C.A. Longul. 2017. The Use of Aromatase Inhibitors in Boys with Short Stature: What to Know Before Prescribing. *Arch Endocrinol Metab*, 391-395.
- McNamara, J.P. 2006. *Principles of Companion Animal Nutrition*. Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Education.

- Minarno, E.B. 2016. Analisis Kandungan Saponin pada Daun dan Tangkai Daun *Carica pubescens* Lenne& K. Koch. *El-Hayah*, 5(4) : 143-152.
- Muhamad, I. 2014. Rational Use of *Jatropha curcas* L. in Food and Medicine. *Citation for Published Version (APA)*, 38.
- Mulyati, B. 2018. Tempe sebagai Pengganti Hormon Esterogen pada Reseptor α dengan Metode Autodock Vina. *Chemical Engineering Research Articles*. 1(1) : 8.
- Nataraja, S.G., H.N. Yu, and S.S. Palmer. 2015. Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulator of Glycoprotein Hormone Receptors. *Frontiers in Endocrinology*, (6): 1-10.
- Norman, A.W., and H.L. Henry. 2015. *Hormones*: Third Edition. Elsevier.
- Novriyanti, E., R. Sumarmin, N. Zayani, S.A. Ramadhani. 2014. Pengaruh Ekstrak Biji Kapas (*Gossypium hirsutum* L.) Terhadap Reproduksi Mencit Betina *Mus musculus* L., Swiss Webster). *Jurnal Sainstek*, 1(1) : 1-16.
- Nurcholis, M. Sumarsih. 2007. Jarak Pagar dan Pembuatan Biodisel. *Kanisius*, 15 : 18-21.
- Nurlayli R. K., dan Hidayati D. S. 2014. Kesepian Pemilik Hewan Peliharaan yang Tinggal Terpisah dari Keluarga. *Jurnal Ilmiah Psikologi Terapan*, 2(1) : 21-33.
- Nwokocha, A. Blessing, I.O. Agbagwa, and B.E. Okoli. 2011. Comparative Phytochemical Screening of *Jatropha* L. Species in the Niger Delta. *Academic Journals*, 1-7.
- Popalayah, Ismaya, dan N. Ngadiyono. 2013. Efektivitas Penggunaan Controlled Internal Drug Release Terhadap Respon Estrus dan Konsentrasi Hormon Estrogen pada Kambing Kacang dan Kambing Bligon. *Buletin Peternakan*, 37(3): 148-156.
- Puspitadewi, S., dan Sunarno. 2007. Potensi Agensia Anti Fertilitas Biji Tanaman Jarak (*Jatropha curcas*) dalam Mempengaruhi Profil Uterus Mencit (*Musmusculus*) Swiss Webster. *Jurnal Sains dan Matematika (JSM)*, 15(2) : 55-60.
- Puspitasari, Y., B.M. Suhita. 2014. Pemberian Ekstrak Ethanol Biji Pepaya (*Carica papaya*) Sebagai Bahan Antifertilitas Alteratif pada Tikus Betina (*Rattus novergicus*) Terhadap Jumlah dan Kualitas Sel Telur. *Veterinaria Medika*, 7(1) : 1-5.
- Rejeki, R.T, T. Harjana, dan Sukiya. 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Kenari (*Canarium indicum*, L.) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putih Betina (*Rattus novergicus*, L.). *Jurnal Prodi Biologi*, (6)3: 196-203.

- Rintafiani. 2014. Siklus Estrus pada Mencit (*Mus musculus*). Jurnal Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (Biologi). *Perkembangan Hewan*, 1-4.
- Rosadi, B., M.A. Setiadi, D. Sajuthi, A. Boediono. 2011. Preservasi Ovarium dan Pengaruhnya Terhadap Morfologi Folikel. *Jurnal Veteriner*, 12(2): 91-97.
- Rusmiati. 2010. Pengaruh Ekstrak Metanol Kulit Kayu Durian (*Durio zibethinus Mur*) pada Struktur Mikroanatomi Ovarium dan Uterus Mencit (*Mus Musculus L*) Betina. *Sains dan Terapan Kimia*, 4(2): 119-129.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Deepublish. Yogyakarta.
- Sardjana, I.K.W. 2013. Pengendalian Populasi Kucing Liar di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya Melalui Kastrasi dan Oviostektomi. *VetMedika J Klin Vet*, 1(2) : 44-46.
- Sarimole, E., M. Martosupono, H. Semangun, J. C. Mangimbulude. 2014. Manfaat Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) Sebagai Obat Tradisional. *Waisai*, 9-11.
- Sasan, J.S., V. Uppal, N. Bansal, dan Anuradha. 2016. Histological Exploration of Graafian and Atretic Follicles of Buffalo Ovary: A Seasonal Study. *Buffalo Bulletin*, 35(1): 135-144.
- Setyaningsih, D., C. Pandji, D.D. Perwatasari. 2014. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Fraksi dan Ekstrak Daun dan Ranting Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) serta Pemanfaatannya pada Produk Personal Hygiene. *Agritech*, 34(2) : 126-136.
- Sharma, M. N. Sharma. Vaginal Cytology : An Historical Perspective on its Diagnostic Use. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, (2): 283-286.
- Shihua, W. 2014. Targeting Aromatase and Estrogen Signaling for Breast Cancer. *Journal of Nanomedicine and Biotherapeutic Discovery*, (4) : 1-4.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principle and Procedures*. Unites States of America. Mosby Inc.
- Skorupskaite, K., J.T. George, dan R.A. Anderson. 2014. *The Kisspeptin GnRH Pathway in Human Reproductive Health and Disease*. Advanced Access Publication, 485-489.
- Srinivasan, M.R., A. Sabarinathan, A. Geetha, K. Shalini, dan M. Sowmiya. 2017. A Comparative Study on Staining Techniques for Vaginal Exfoliative Cytology of Rat. *Journal of Pharmacology and Clinical Research*, 3(3): 1-4.

- Sulistiyaning, D., dan A.N. Fadill. 2017. Perancangan Kampanye Sosial Sterilisasi untuk Hewan Pemeliharaan Di Jakarta. *e-Procceding of Art and Design*. 4(3) : 430-431.
- Tomac J. 2011. Biology of the Corpus Luteum. *Periodicum Biologorum*. 113(1) : 43-49.
- Wahyu, H., B. Rahmatina, Herman, A. Amir. 2016. Pengaruh Perbedaan Dosis Ekstrak Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Terhadap Jumlah Spermatozoa Motil Berat Testis, dan Diameter Testis pada Mencit Jantan (*Mus Musulus*). *Jurnal Kesehatan Andalas*, 5(2): 462-469.
- Westwood, F.R. 2008. The Female Rat Reproduction Cycle : A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicology Phathology*, 36 : 375-384.
- Wiknjosastro, H. 2005. *Ilmu Kebidanan*. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Jakarta : 45-54.
- Wink, M. 2015. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2 : 251-286.
- Yakubu, M.T., M.A. adewumi, A.T. Oladiji, A.W. Olajide, Olatinwo, A.A. Adesokan, M.O. Yakubu, B.V. Owoyele, T.O. Sunmonu, M.S. Ajao. Effect of Cnidioscolous Aconitifolius (Miller) I.M. Joshnston Leaf Extract on Reproductive Hormones of Female Rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 6(3) : 149-155.
- Yanuartono, H., Purnamaningsih, A. Nururrozi, dan S. Indarjulianto. 2017. Saponin: Dampak Terhadap Ternak. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 6(2): 79-90.

