



**PENGARUH PAPARAN SIPERMETRIN DOSIS
RENDAH PER ORAL TERHADAP JUMLAH SEL
GRANULOSA DAN INDEKS APOPTOSIS PADA SEL
GRANULOSA FOLIKEL TIKUS BETINA GALUR
WISTAR**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



OLEH :

**NOVITA EKA KUSUMA WARDANI
156070400111009**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**



IDENTITAS TIM PENGUJI

| NAMA | KOMISI PENGUJI | DIVISI |
|---|--------------------|---|
| Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes NIP. 196603231997032001 | Ketua | Laboratorium Mikrobiologi |
| Dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M NIP. 196701231996011001 | Anggota Penguji | Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya |
| dr. Sutrisno, Sp. OG (K) NIP. 196802031998031005 | Anggota Penguji | Rumah Sakit Syaiful Anwar |
| Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si, SpA (K) NIP. 197307262005011008 | Anggota Penguji | Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya |

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 22 Agustus 2017

Mahasiswa.
METERAI TEMPEL
9385BAEF283961963
6000
DAN BERSU KUPAH
Nama : Novita Eka Kusuma wardani
NIM : 156070400111009
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran



RIWAYAT HIDUP

Novita Eka Kusuma Wardani, lahir di Gresik, 30 November

1984. Anak pertama dari tiga bersaudara putri dari Bapak

Koeswiyantoko dan Ibu Muntianah, S.Si. Lulus SD Negeri

Petrokimia Gresik tahun 1997, lulus SLTP Negeri I Gresik

tahun 2000, lulus SMU Negeri I Gresik tahun 2003. Tahun 2003 melanjutkan

pendidikan DIII Kebidanan di Prodi Kebidanan Sutomo Poltekkes Surabaya, lulus

tahun 2006. Melanjutkan pendidikan DIV Kebidanan di Universitas Sebelas Maret,

lulus tahun 2008. Pada tahun 2015 melanjutkan pendidikan di program studi Magister

Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tahun 2008 sampai tahun

2010 penulis bekerja sebagai dosen di Sekolah Tinggi Kesehatan Muhammadiyah

Lamongan dan tahun 2010 sampai sekarang bekerja sebagai staf pengajar di prodi

Kebidanan Bangkalan Poltekkes Kemenkes Surabaya.





UCAPAN TERIMA KASIH

*Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Papa dan Mama tercinta,
Suamiku tercinta, Novi Chandra Putra
Serta anakku tersayang, M.Hafizh Alfakhri*



RINGKASAN

Novita Eka Kusuma Wardani

Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis rendah Per Oral Terhadap Jumlah Sel Granulosa, dan Indeks Apoptosis Pada Sel Granulosa Folikel Tikus Betina Galur Wistar, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi pembimbing: Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes, Anggota: dr.Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M.

Penggunaan pestisida dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan kerusakan pada organ reproduksi. Kadar residu pestisida jenis sipermetrin ditemukan pada sayur dan buah di beberapa kota ditemukan dan jumlahnya melebihi batas maksimum residu pestisida menurut SNI yaitu 0,05 mg/kgBB. Sipermetrin selama dimetabolisme di tubuh menguraikan *cyanohydrine* yang memicu terjadinya ROS. Tingginya ROS dapat memicu apoptosis pada sel granulosa folikel tikus. Paparan sipermetrin dosis rendah per oral dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan infertilitas pada wanita.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap jumlah sel granulosa dan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar. Penelitian ini menggunakan metode *true experimental post test only control group*, menggunakan hewan coba tikus betina galur wistar sejumlah 24 ekor yang dibagi dalam 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (dosis 10 mg/kgBB, 15 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB). Paparan sipermetrin diberikan satu kali sehari selama 28 hari. Organ ovarium diambil kemudian mengamati jumlah sel granulosa folikel tersier menggunakan pewarnaan *Haematoxylin eosin* dan indeks apoptosis sel granulosa folikel tersier dianalisis menggunakan TUNNEL assay. Penghitungan jumlah sel granulosa menggunakan software Fiji. Analisis statistik menggunakan *one way ANNOVA* dan uji regresi.

Hasil analisis jumlah sel granulosa dengan menggunakan *one way ANOVA*, didapatkan p-value sebesar 0.865 lebih besar dari $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa folikel primer, sedangkan pada hasil analisis jumlah sel granulosa pada folikel sekunder dan tersier didapat *p value* 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa folikel sekunder dan tersier antar kelompok, baik. Hasil analisis indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier dengan menggunakan *one way ANOVA*, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan. Berdasarkan hasil analisis regresi didapatkan hasil bahwa pemberian paparan sipermetrin mampu mempengaruhi terhadap penurunan jumlah sel granulosa folikel sekunder sebesar 88.7 % dan pada sel granulosa folikel tersier 91.2% dan peningkatan Indeks apoptosis sebesar 79.9 % pada sel granulosa folikel primer, 79.1 % pada sel folikel sekunder dan 73.35% pada folikel tersier

Paparan sipermetrin dosis rendah per oral tidak terbukti menurunkan jumlah sel granulosa folikel primer, terbukti secara signifikan dapat menurunkan jumlah sel granulosa folikel sekunder dan tersier dan meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier.

SUMMARY

Novita Eka Kusuma Wardani

Effect of Low Dose Oral Cypermethrin Exposure on The Granulosa Cells Count and Apoptotic Index of Granulosa Cells in Female Wistar Rat Follicle, Master of Midwifery Program of Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Chairman of Supervisor Commission: Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes; Members: dr.Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M.

The use of pesticides for a long time periods can caused damage on reproductive organs. On some cities, level of pesticide residues, cypermethrin, which founded on fruits and vegetables were above the maximum limits of SNI (0.05 mg/kgBB). Low dose oral exposure of cypermethrin for a long time periods can caused infertility for the women. During the metabolism of the body, cypermethrin forming Cyanohydrine which can induce ROS (Reactive Oxygen Species). High levels of ROS inside the body can cause apoptosis in granulosa cells.

The aim of this research is to prove that apoptosis in granulosa cells can be caused by a low dose oral exposure of cypermethrin agains the number of granulosa cells and apoptosis granulosa follicles cell index on females mouse wistar strain. True experimental post test only control group methods were used on this research, which using of 24 mice (wistar strain) which are divide in one control group and three treatment groups (dose of 10 mg/kgBB, 15 mg/kgBB and 20 mg/kgBB). Cypermethrin exposure were given once per day for 28 days. Sample of ovarium organ were taken to calculate the numbers of granulosa follicles cell using Haematoxilen eosin for coloring technique and apoptosis granulosa follicles cell index analysis using TUNNEL assay. Fiji® software were used to count the numbers of granulosa cells and also one way ANNOVA and regression method were also used for statistical analysis on this research.

Both analysis reports (the number of granulosa cells and to calculate the apoptotic index of granulosa cell follicles) using one way ANNOVA shows that the p-value were 0.000 smaller than $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$). From this point, we can take conclusion that there are significance difference between the numbers of granulosa cells on each groups, even in the control group or the treatment groups. Based on regression analysis reports, the injections of cypermethrin can affect the decrease of granulosa cells at 91.2% and also increase the numbers of apoptosis index at 73.35%.

Low dose oral exposure of cypermethrin for a long time periods were proved to decrease the numbers of granulosa secondary and tertiary follicles cell per significantly, increase the numbers of granulosa primary follicles and also increase the numbers of apoptosis index of granulosa primary, secondary and tertiary follicles cell significantly.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul **Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per**

Oral terhadap Jumlah Sel Granulosa dan Indeks Apoptosis Pada Sel Granulosa Folikel Tikus Betina Galur Wistar. Tak lupa penulis sampaikan rasa hormat dan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp. OG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



4. Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M. Kes selaku ketua komisi pembimbing dan dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M selaku anggota pembimbing yang telah membagikan ilmu, membimbing dan memberi masukan serta dukungan kepada penulis untuk kesempurnaan tesis ini.

5. dr. Sutrisno, Sp.OG (K) selaku penguji I dan Dr. dr. Wisnu Barlianto M.Si. Med, Sp. A (K) selaku penguji II yang telah membagikan ilmu, memberi saran dan masukan kepada penulis untuk kesempurnaan tesis ini.

6. Seluruh dosen dan staf akademik khususnya di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas bantuannya dalam menyelesaikan tesis ini.

7. Seluruh teman Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang angkatan 2015 atas dukungannya dalam penyelesaian tesis ini.

8. Keluarga yang telah memberikan doa dan dukungan dalam penyelesaian tesis ini.

9. Suami dan anakku tercinta atas dukungan dan pengorbanan yang besar dalam mendukung penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi banyak pihak.

Malang, Agustus 2017

Penulis



DAFTAR ISI

| | |
|---|-------|
| LEMBAR PERSETUJUAN..... | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN..... | iii |
| PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS..... | iv |
| HALAMAN PERUNTUKAN..... | v |
| RINGKASAN..... | vi |
| SUMMARY..... | vii |
| KATA PENGANTAR..... | viii |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR TABEL..... | xiii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xviii |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xxi |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Masalah..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.3.1 Tujuan Umum..... | 6 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus..... | 7 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 7 |
| 1.4.1 Manfaat Teoritis..... | 7 |
| 1.4.2 Manfaaat Praktis..... | 7 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1 Piretroid..... | 8 |
| 2.1.1 Karakteristik Piretroid..... | 8 |
| 2.1.2 Klasifikasi Piretroid..... | 9 |
| 2.2 Sipermetrin..... | 10 |
| 2.2.1 Karakteristik Sipermetrin..... | 10 |
| 2.2.2 Residu Sipermetrin..... | 11 |
| 2.2.3 Farmakokinetik Sipermetrin dalam Tubuh..... | 13 |
| 2.2.4 Biomarker untuk Deteksi Sipermetrin..... | 14 |
| 2.2.5 Toksisitas Sipermetrin..... | 15 |
| 2.2.6 Radikal Bebas dan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)..... | 16 |



| | |
|--|-----------|
| 2.3 Apoptosis..... | 18 |
| 2.3.1 Pengertian Apoptosis..... | 18 |
| 2.3.2 Fungsi Apoptosis..... | 19 |
| 2.3.3 Jenis Apoptosis..... | 20 |
| 2.3.4 Mekanisme Apoptosis..... | 22 |
| 2.4 Folikel Ovarium..... | 27 |
| 2.4.1 Anatomi, Morfologi dan Histologi Ovarium..... | 27 |
| 2.4.2 Folikulogenesis..... | 29 |
| 2.4.3 Sel Granulosa..... | 33 |
| 2.4.3.1 Pertumbuhan dan Perkembangan Sel Granulosa..... | 33 |
| 2.4.3.2 Peran Sel Granulosa Dalam Regulasi Ovarium..... | 36 |
| 2.4.3.3 Jumlah Sel Granulosa Berdasarkan Perkembangan Folikel..... | 36 |
| 2.4.4 Mekanisme Hipotalamus - Pituitari - Gonadal Axis..... | 37 |
| 2.4.5 Mekanisme Pestisida sebagai <i>Endocrine Disruptor</i> | 38 |
| 2.4.6 Mekanisme Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa dan Indeks Apoptosis Sel Granulosa..... | 39 |
| 2.5 Hewan Coba..... | 43 |
| 2.5.1 Jenis dan Karakteristik Hewan Coba..... | 43 |
| 2.5.2 Anatomi dan Fisiologi Sistem Reproduksi Tikus..... | 44 |
| 2.5.3 Pemeliharaan Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 46 |
| 2.5.4 Siklus Estrus <i>Rattus norvegicus</i> | 47 |
| 2.5.5 Perkembangan Folikel Pada Ovarium Tikus..... | 48 |
| 2.5.6 Apoptosis Sel Granulosa Mamalia..... | 48 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEP, KERANGKA TEORI DAN HIPOTESIS..... | 49 |
| 3.1 Kerangka Teori..... | 49 |
| 3.2 Kerangka Konsep..... | 50 |
| 3.2 Hipotesis..... | 51 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN..... | 52 |
| 4.1 Desain Penelitian..... | 52 |
| 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 52 |
| 4.3 Sampel Penelitian..... | 53 |
| 4.3.1 Kriteria Sampel..... | 53 |
| 4.3.2 Besar Sampel..... | 53 |
| 4.3.3 Pembagian Kelompok..... | 54 |
| 4.4 Variabel Penelitian..... | 54 |
| 4.4.1 Variabel Independen..... | 54 |
| 4.4.2 Variabel Dependen..... | 54 |
| 4.5 Definisi Operasional..... | 55 |
| 4.6 Bahan dan Alat Penelitian..... | 56 |
| 4.6.1 Bahan Penelitian..... | 56 |
| 4.6.2 Alat Penelitian..... | 57 |
| 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data..... | 58 |
| 4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba..... | 58 |
| 4.7.2 Pemeliharaan Hewan Coba..... | 58 |



| | | |
|--------------------------------------|--|------------|
| 4.7.3 | Penimbangan Hewan Coba..... | 59 |
| 4.7.4 | Pemberian Sipermetrin..... | 59 |
| 4.7.5 | Pembuatan Larutan Sipermetrin dan Penentuan Dosis..... | 59 |
| 4.7.6 | Penentuan Siklus Estrus..... | 61 |
| 4.7.7 | Pelaksanaan Penelitian..... | 61 |
| 4.7.8 | Pembedahan Hewan Coba..... | 61 |
| 4.7.9 | Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium..... | 63 |
| 4.7.10 | Prosedur Pewarnaan Haematoxilen Eosin..... | 65 |
| 4.7.11 | Analisis Jumlah Sel Granulosa..... | 66 |
| 4.7.12 | Prosedur <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick end Labelling (TUNEL) Assay</i> | 66 |
| 4.7.13 | Analisis Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel..... | 68 |
| 4.8 | Teknik Analisa Data..... | 69 |
| 4.8.1 | Uji Normalitas Data..... | 69 |
| 4.8.2 | Uji Homogenitas..... | 69 |
| 4.8.3 | Uji Korelasi..... | 69 |
| 4.8.4 | Analisis Regresi..... | 70 |
| 4.8.5 | Uji <i>One Way Anova</i> | 70 |
| 4.9 | Alur Penelitian..... | 71 |
| BAB 5 HASIL PENELITIAN..... | | 72 |
| 5.1 | Gambaran Umum Hasil Penelitian..... | 72 |
| 5.2 | Pengujian Asumsi Yang Melandasi ANOVA..... | 73 |
| 5.3 | Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel..... | 76 |
| 5.4 | Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis..... | 86 |
| 5.5 | Pengujian Regresi Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa dan Folikel..... | 96 |
| BAB 6 PEMBAHASAN..... | | 102 |
| 6.1 | Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per Oral Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer, Sekunder dan Tersier..... | 103 |
| 6.2 | Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per Oral Terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer, Sekunder dan Tersier..... | 107 |
| 6.3 | Keterbatasan Penelitian..... | 109 |
| BAB 7 SIMPULAN DAN SARAN..... | | 110 |
| 7.1 | Simpulan..... | 110 |
| 7.2 | Saran..... | 110 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | | 111 |
| LAMPIRAN..... | | 120 |
| RIWAYAT HIDUP..... | | 159 |



DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabel 2.1 | Batas Maksimum Residu Sipermetrin Pada Makanan..... | 12 |
| Tabel 2.2 | Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis..... | 26 |
| Tabel 2.3 | Pembagian Folikel dan Jumlah Sel Granulosa..... | 36 |
| Tabel 2.4 | Klasifikasi Hewan Percobaan..... | 43 |
| Tabel 2.5 | Data Fisiologi dan Reproduksi <i>Rattus norvegicus</i> Betina..... | 45 |
| Tabel 4.1 | Definisi Operasional Penelitian..... | 56 |
| Tabel 4.2 | Konsentrasi Alkohol..... | 64 |
| Tabel 5.1 | Gambaran Berat Badan Tikus Selama Proses Penelitian..... | 72 |
| Tabel 5.2 | Uji Asumsi Normalitas..... | 74 |
| Tabel 5.3 | Uji Asumsi Homogenitas Ragam..... | 75 |
| Tabel 5.4 | Uji Asumsi Homogenitas Ragam Variabel Jumlah Sel Granulosa Yang Telah Ditransformasi..... | 75 |
| Tabel 5.5 | Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer dengan <i>One Way Anova</i> | 78 |
| Tabel 5.6 | Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder dengan <i>One Way Anova</i> | 81 |
| Tabel 5.7 | Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier dengan <i>One Way Anova</i> dan Tamhane 5 %..... | 84 |
| Tabel 5.8 | Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer dengan Uji <i>One Way Anova</i> dan LSD 5%..... | 88 |



DAFTAR TABEL

Tabel 5.9 Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder dengan One Way Anova..... 91

Tabel 5.10 Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier dengan Uji Anova dan LSD 5%..... 94

Tabel 5.11 Hasil Analisis Regresi Jumlah Sel Granulosa dan Indeks Apoptosis..... 96



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Sipermetrin..... | 10 |
| Gambar 2.2 | Struktur Kimia Sipermetrin..... | 11 |
| Gambar 2.3 | Mekanisme Apoptosis Melalui Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik..... | 23 |
| Gambar 2.4 | Perbedaan Nekrosis dan Apoptosis..... | 25 |
| Gambar 2.5 | Anatomi Organ Reproduksi Wanita..... | 27 |
| Gambar 2.6 | Folikel Ovarium Pada Wanita Dewasa..... | 28 |
| Gambar 2.7 | Tahapan Folikulogenesis Dalam Ovarium..... | 31 |
| Gambar 2.8 | Sel Granulosa Pada Folikel Tersier..... | 33 |
| Gambar 2.9 | Pertumbuhan dan Perkembangan Folikel dan Sel Granulosa..... | 34 |
| Gambar 2.10 | <i>Hipotalamus – Pituitary – Gonadal Axis</i> | 37 |
| Gambar 2.11 | <i>Rattus norvegicus</i> Galur Wistar..... | 43 |
| Gambar 2.12 | Anatomi Reproduksi <i>Rattus norvegicus</i> Betina..... | 44 |
| Gambar 2.13 | Kandang Pemeliharaan Tikus..... | 46 |
| Gambar 3.1 | Kerangka Teori..... | 49 |
| Gambar 3.2 | Kerangka Konsep..... | 50 |
| Gambar 4.1 | Alur Penelitian..... | 71 |
| Gambar 5.1 | Grafik Pertumbuhan Berat Badan Tikus Selama Penelitian..... | 73 |
| Gambar 5.2 | Sel Granulosa Folikel Primer Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Dengan Berbagai Dosis Menggunakan Pewarnaan HE dengan Pembesaran 200 Kali..... | 77 |
| Gambar 5.3 | Histogram Rata-rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer..... | 79 |

**DAFTAR GAMBAR**

| | | |
|-------------|--|----|
| Gambar 5.4 | Sel Granulosa Folikel Sekunder Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Dengan Berbagai Dosis Menggunakan Pewarnaan HE dengan Pembesaran 200 Kali..... | 80 |
| Gambar 5.5 | Histogram Rata-rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 82 |
| Gambar 5.6 | Sel Granulosa Folikel Tersier Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Dengan Berbagai Dosis Menggunakan Pewarnaan HE dengan Pembesaran 200 Kali..... | 83 |
| Gambar 5.7 | Histogram Rata-rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 85 |
| Gambar 5.8 | Apoptosis Pada Sel Granulosa Folikel Primer Pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Berbagai Dosis Menggunakan TUNEL Assay Dengan Pembesaran 400 Kali..... | 87 |
| Gambar 5.9 | Histogram Rata-rata Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 89 |
| Gambar 5.10 | Apoptosis Pada Sel Granulosa Folikel Sekunder Pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Berbagai Dosis Menggunakan TUNEL Assay Dengan Pembesaran 400 Kali..... | 90 |
| Gambar 5.11 | Histogram Rata-rata Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 92 |
| Gambar 5.12 | Apoptosis Pada Sel Granulosa Folikel Tersier Pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan dengan Berbagai Dosis Menggunakan TUNEL Assay Dengan Pembesaran 400 Kali..... | 93 |
| Gambar 5.13 | Histogram Rata-rata Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 95 |
| Gambar 5.14 | Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 97 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|-------------|---|----|
| Gambar 5.15 | Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier | 97 |
| Gambar 5.16 | Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 98 |
| Gambar 5.17 | Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 99 |
| Gambar 5.18 | Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 99 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|---|-----|
| Lampiran 1 | Surat Keterangan Laik Etik..... | 120 |
| Lampiran 2 | Surat Keterangan Turnitin..... | 121 |
| Lampiran 3 | Katalog in situ Apoptosis Detection Kit..... | 122 |
| Lampiran 4 | Berat Badan Tikus Sebelum dan Selama Perlakuan..... | 123 |
| Lampiran 5 | Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer..... | 124 |
| Lampiran 6 | Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 125 |
| Lampiran 7 | Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 126 |
| Lampiran 8 | Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 127 |
| Lampiran 9 | Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 128 |
| Lampiran 10 | Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 129 |
| Lampiran 11 | Uji Normalitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 130 |
| Lampiran 12 | Uji Normalitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer..... | 131 |
| Lampiran 13 | Uji Normalitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 132 |
| Lampiran 14 | Uji Normalitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 133 |
| Lampiran 15 | Uji Normalitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 134 |
| Lampiran 16 | Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 135 |
| Lampiran 17 | Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer..... | 136 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|--|-----|
| Lampiran 18 | Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 137 |
| Lampiran 19 | Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 138 |
| Lampiran 20 | Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 139 |
| Lampiran 21 | Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 140 |
| Lampiran 22 | One Way ANOVA Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer..... | 141 |
| Lampiran 23 | One Way ANOVA Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 142 |
| Lampiran 24 | One Way ANOVA Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 143 |
| Lampiran 25 | One Way ANOVA Indeks Apoptosis sel Granulosa Folikel Primer..... | 144 |
| Lampiran 26 | One Way ANOVA Indeks Apoptosis sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 145 |
| Lampiran 27 | One Way ANOVA Indeks Apoptosis sel Granulosa Folikel Tersier..... | 146 |
| Lampiran 28 | Analisis Korelasi Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 147 |
| Lampiran 29 | Analisis Regresi Linier Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 148 |
| Lampiran 30 | Analisis Regresi Linier Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer..... | 149 |
| Lampiran 31 | Analisis Regresi Linier Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder..... | 150 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|---|-----|
| Lampiran 32 | Analisis Regresi Linier Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier..... | 151 |
| Lampiran 33 | Foto-Foto Kegiatan..... | 152 |
| Lampiran 34 | Bukti Submit Jurnal..... | 156 |
| Lampiran 35 | Penghitungan Indeks Apoptosis..... | 157 |
| Lampiran 36 | Penghitungan Jumlah Sel Granulosa..... | 158 |



DAFTAR SINGKATAN

ATSDR : *Agency For Toxic Substances And Disease Registry*

AST : *Aspartate Transaminase*

ALT : *Alanine Transaminase*

ALP : *Alkaline Phosphatase*

BMR : *Batas Maksimum Residu*

BCL-2 : *B – cell Lymphoma 2*

Bax : *BCL – associated x protein*

CAT : *Catalase*

CDK : *Cyclin – dependent kinase*

DNA : *Deoxyribonucleic Acid*

EPA : *Enviromental Protection Agency*

FSH : *Follicle Stimulating Hormone*

GST : *Glutathionine S- Transferase*

GPX : *Glutathionine Peroxidase*

LH : *Luteinizing Hormone*

RNA : *Ribonucleic Acid*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TUNEL : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SOD : *Superoxide Dismutase*

VGCC : *Voltage Gate Calcium Channel*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pestisida merupakan zat kimia yang digunakan pada sektor pertanian untuk mengontrol atau membunuh hama, baik yang berupa tumbuhan, serangga maupun hewan lain. Penggunaan pestisida tidak bisa dihindari di sektor pertanian, industri, dan rumah tangga. Namun, penggunaan pestisida yang berlebihan dapat membahayakan makhluk hidup di air dan darat serta membahayakan manusia karena keberadaannya di rantai makanan (Kotil dan Yon, 2015). Insektisida merupakan jenis pestisida untuk memberantas serangga. Penggolongan insektisida ada empat macam berdasarkan cara kerjanya, yaitu organofosfat, organoklorin, karbamat dan piretroid (Hudayya, 2012). Pemerintah mengatur penggunaan pestida dalam Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia nomor 107 tahun 2014 tentang pengawasan pestisida (Kementan, 2015).

Penggunaan insektisida dalam jangka panjang dapat mengganggu fungsi organ meliputi gangguan saraf, endokrin, reproduksi, ginjal, dan sistem pernapasan (Abdollahi *et al.* 2004; Souza *et al.* 2011). Insektisida jenis piretroid dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui beberapa cara, antara lain melalui makanan yang terpapar piretroid, udara yang terpapar piretroid dan kontak langsung dengan kulit. Piretroid dapat langsung diabsorpsi oleh tubuh ketika terpapar melalui makanan atau pernafasan, tetapi tidak langsung diabsorpsi tubuh ketika terpapar dengan kulit (WHO, 2006).



Sipermetrin merupakan jenis piretroid sintetik tipe 2 yang banyak digunakan petani karena memiliki toksisitas rendah untuk mamalia dan merupakan insektisida spektrum luas (Ince, 2012). Di Amerika, penggunaan sipermetrin diijinkan selama tidak melebihi batas penggunaan maksimum per hari yaitu 0,02 mg/kg (ATSDR, 2003; EPA, 2006). Sedangkan di Indonesia juga mengijinkan penggunaan sipermetrin selama tidak melebihi batas maksimum yaitu antara 0,02 – 2 mg/kg (Kementan, 2015). Penggunaan sipermetrin secara tidak tepat dapat mengganggu lingkungan dan kesehatan. Sipermetrin merupakan racun anonyx, yaitu racun yang menyerang serabut syaraf. Senyawa ini berbahaya bagi manusia karena menyerang sistem syaraf dan organ yang berhubungan dengan tempat bahan kimia memasuki tubuh (Djojsumarto, 2008). Gejala toksisitas sipermetrin pada mamalia dapat ditunjukkan dengan adanya peningkatan saliva, kurangnya koordinasi tubuh, tremor otot dan kejang klonik-tonik (EPA, 2006). Angka kejadian infertilitas di Indonesia adalah 25 %. Pestisida merupakan salah satu faktor resiko infertilitas pada wanita (POGI, 2013). Sebanyak 2 wanita dari 3 wanita yang terpajan pestida di Kabupaten Brebes mengalami infertilitas serta 56,5 % terindikasi infertil berdasarkan pemeriksaan kadar FSH dan 78,3 % terindikasi infertil berdasarkan pemeriksaan LH (Risna, 2016).

Kadar residu sipermetrin dalam sayur kemangi di kota Malang terdeteksi 0,004 mg/kg (Linawati, 2011). Kadar residu sipermetrin dalam produk jambal roti ikan manyung yang diproduksi di Kabupaten Lamongan Jawa Timur terdeteksi sebesar 0,027 – 2,124 mg/kg (Nursinah, 2014). Kadar residu sipermetrin pada kubis di Padang mencapai 2,08 mg/kg (Loekman *et al.* 2005). Jumlah residu ini berada diatas ambang batas normal residu



pestisida menurut SNI 7313 : 2008 yaitu 0,05 mg/kg (BSN, 2008). Paparan pestisida dapat menimbulkan keracunan akut dan kronis. Keracunan kronis dapat terjadi akibat penyerapan secara terus menerus dalam jangka waktu yang lama bahkan kadang-kadang seumur hidup, walaupun dalam dosis yang sangat rendah. Keracunan kronis dapat menyebabkan kerusakan sel hati. Residu yang terakumulasi dalam lemak dapat mengakibatkan kerusakan hati dan ginjal (Mutiatikum *et al.* 2003). Gugus *alfa cyano* pada atom karbon *benzyllic* yang terdapat pada sipermetrin dapat meningkatkan aktivitas enzim AST, ALT, dan ALP, sehingga merusak fungsi liver dan mengubah permeabilitas membran liver (Mossa *et al.* 2005).

Sipermetrin mengandung isomer *cis* dan *trans* yang dapat menyebabkan metabolisme oksidasi dan hidrolisis di dalam tubuh. Metabolisme sipermetrin terjadi di liver dan melibatkan sitokrom p450. Adanya *xenobiotic* dalam tubuh dapat menginduksi produksi sitokrom p450, sehingga meningkatkan aktivitas metabolisme isomer *cis* di liver dan jaringan steroid, termasuk ovarium (Devine, 2012). Tingginya metabolisme dalam sel dapat menyebabkan isomer *cis* lebih reaktif dan akhirnya menjadi radikal bebas. Banyaknya radikal bebas memicu terjadinya *Reactive Oxygen Species (ROS)*. Metabolisme sipermetrin juga membentuk *cyanohydrines* yang terurai menjadi *cyanide* dan *aldehydes* yang dapat memicu ROS (Wielgomas dan Krechniak, 2007). Peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species (ROS)* dapat meningkatkan lipid peroksidase dan menurunkan enzim antioksidannya (SOD, CAT, GST, GPX), sehingga menyebabkan stress oksidatif pada sel granulosa folikel ovarium, sel eritrosit, liver dan ginjal. (Hussien *et al.* 2011; Wielgomas dan Krechniak, 2007; Sankar, 2011, Molavi *et al.* 2014).



Banyaknya sel yang mengalami stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan DNA, membrane lipid dan protein (Turrens, 2003). Peningkatan ROS dapat menyebabkan inisiasi terjadinya apoptosis sel granulosa (Tebourbi *et al.* 2011).

Sipermetrin dapat masuk ke peredaran darah dan dapat menembus sawar otak, sehingga mengganggu kinetik dan influx channel melalui inhibisi *Voltage Gate Calcium Channel* (Martin *et al.* 2000). *Voltage Gate Calcium Channel* (VGCC) merupakan pengatur enzim jalur sinyal transduksi yaitu enzim *proteinase* dan *phosphatase*. Inositol trifosfat (IP₃) - mediated calcium influx diatur oleh reaksi fosforilasi dengan menggabungkan Ca²⁺ dependent serin (*calcineurin*) melalui reseptor IP₃ - *peptidyl - prolyl - cis - trans isomerase FK - 506 binding protein BP 12*. Sipermetrin merupakan inhibitor kuat terhadap *calcineurin*, sehingga mengganggu channel Ca²⁺ influx dan menurunkan kadar kalsium seluler sehingga menurunkan pengeluaran neurotransmitter (Bretveld *et al.* 2006; Wu *et al.* 2005). Neurotransmitter dibutuhkan untuk meneruskan rangsangan hipotalamus agar mensekresi GnRH (Gold, 2011). GnRH diperlukan untuk merangsang kelenjar hipofise anterior untuk mengeluarkan FSH. Apabila sekresi GnRH menurun, maka dapat menurunkan produksi *Follicle Stimulating Hormone*. FSH diperlukan untuk folikulogenesis dan proliferasi sel granulosa, (Sharma dan Bhardwaj, 2012). FSH bekerja pada reseptor di membran sel granulosa. Sinyal transduksinya ditransmisikan melalui beberapa mekanisme intraseluler, seperti aktivasi PKA, MAPK dan jalur sinyal lain (Hunzicker dan Maizels, 2006). Turunnya kadar FSH dapat menyebabkan atresia folikel dan kematian sel granulosa (Minehata, 2006).



Sipermetrin dengan dosis 50 mg/KgBB dapat meningkatkan atresia folikel dan menurunkan konsentrasi protein, lipid, fosfolipid dan kolesterol (Sangha *et al.* 2012). Sipermetrin mempunyai sifat lipofilik dan hasil metabolismenya banyak terakumulasi di kelenjar adrenal, kulit, jantung, sel darah, ovarium (Manna, 2004). Hasil metabolit sipermetrin yang berupa *3-phenoxybenzyl alcohol*, *3-(4-hydroxy-3-phenoxy) benzyl alcohol*, dan *3-phenoxybenzaldehyde* juga memiliki sifat menyerupai 17β estradiol dan berikatan dengan reseptor estrogen pada manusia (McCharty, 2005). Efek yang terjadi dengan tingginya xenoestrogen adalah turunnya pulsasi GnRH dari hipotalamus (umpan balik negatif) dan sekresi FSH dan LH oleh kelenjar pituitary anterior (Agha, 2015). Akibatnya, kadar FSH, LH dan estradiol dalam tubuh menurun (Bretveld, 2006). Pada penelitian tikus *immature hypophysectomized* yang dipapar estrogen selama 2 hari kemudian paparan estrogen dihentikan, maka terjadi apoptosis sel folikel dan fragmentasi DNA pada sel granulosa secara masif (Vasquez *et al.* 2011).

Folikulogenesis merupakan tahap penting untuk fertilitas wanita dan melibatkan perubahan morfologi dan fisiologi sel granulosa dan sel theca (Xuan, 2003). Perkembangan dan diferensiasi folikel sangat penting karena menentukan kualitas oosit, seleksi folikel dominan dan menentukan kesuburan wanita (Cheon, 2012). Perkembangan folikel dapat diamati melalui pengamatan jumlah sel granulosa, diameter folikel dan pembentukan antrum (Baerwald *et al.* 2012; Cuiling *et al.* 2005). Apoptosis pada sel granulosa dapat diobservasi pada folikel sekunder dan tersier karena folikel sekunder dan tersier lebih sensitif mengalami stress oksidatif (Devine *et al.* 2012). Morfologi sel yang mengalami apoptosis



adalah piknosis, *karyorrhexis* dan *karyolysis* (Comack, 2001). Pada sel yang apoptosis, nukleus mengalami kondensasi, marginalisasi kromatin dan terfragmentasi menjadi beberapa gumpalan kromatin yang teratur dan kemudian dikemas dalam *apptotic body* (Niquet *et al.* 2003). Pada analisis DNA sel apoptosis, tampak inti sel mengandung DNA yang terfragmentasi. Derajat apoptosis dapat diukur dengan menghitung indeks apoptosis suatu sel (Loo, 2010).

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti ingin membuktikan pengaruh paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap jumlah sel granulosa dan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah paparan sipermetrin dosis rendah per oral dapat menurunkan jumlah sel granulosa dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk membuktikan paparan sipermetrin dosis rendah per oral dapat menurunkan jumlah sel granulosa dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar.



1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan pengaruh paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap penurunan jumlah sel granulosa pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar.

2. Membuktikan pengaruh paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap peningkatan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat teoritis

Dapat digunakan sebagai rujukan di bidang penelitian tentang pengaruh sipermetrin terhadap kesehatan reproduksi wanita.

1.4.2 Manfaat praktis

1. Dapat dijadikan rujukan bagi masyarakat untuk mengetahui pengaruh paparan sipermetrin.
2. Memberikan informasi kepada masyarakat untuk dapat meminimalkan penggunaan sipermetrin dalam kehidupan sehari-hari.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Piretroid

2.1.1 Karakteristik Piretroid

Piretroid adalah jenis insektisida sintetik yang berasal dari piretrin.

Piretrin merupakan bahan insektisida aktif yang berasal dari bunga krisan

(Li *et al.*, 2016). Piretroid merupakan bahan kimia yang memiliki struktur

kimia yang sama dengan piretrin, tetapi memiliki sifat lebih toksik pada

serangga (ATSDR, 2003). Banyak piretroid yang memiliki efek sebagai

racun kontak yang sangat kuat. Beberapa diantaranya *tertrametrin*, yang

memiliki sifat efek *knock down* sangat kuat (Djojosumarto, 2008).

Piretroid pada umumnya memiliki spektrum pengendalian yang luas

(*broad spectrum*) dan efektif terhadap banyak spesies serangga hama

dari ordo Lepidoptera, coleoptera, diptera, orthoptera, homoptera,

heteroptera dan tysanoptera. Cara kerja piretroid yaitu mempengaruhi

susunan saraf sentral serangga (Djojosumarto, 2008). Piretroid terikat pada

protein saraf yang dikenal sebagai *voltage gate sodium channel*. Pada

keadaan normal, protein membuka untuk memberi rangsangan pada saraf

dan menghentikan sinyal saraf. Piretroid terikat pada gerbang ini dan

mencegah saraf menutup secara normal yang menghasilkan rangsangan

saraf secara berkelanjutan. Hal ini menyebabkan tremor dan gerakan

tidak terkoordinasi pada system saraf (Singh, A.K. *et al.*, 2012).



2.1.2 Klasifikasi Piretroid

Menurut Djojosumarto (2008), Saat ini dikembangkan 4 (empat) generasi piretroid, yaitu generasi I (Alletrin), generasi II (Resmetrin), generasi III (Fenvalerat, permetrin) dan generasi IV (deltametrin, fluvalinat dan sipermetrin). Jenis piretroid berdasarkan kepekaan terhadap cahaya dibedakan menjadi 2, yaitu :

1. *Light sensitive piretroid*

Yaitu piretroid yang sensitif terhadap cahaya.

Yang termasuk dalam golongan ini adalah alletrin, tetrametrin dan resmetrin.

2. *Photostable piretroid*

Yaitu piretroid yang stabil terhadap cahaya.

Yang termasuk dalam golongan ini adalah sipermetrin, deltametrin, α -sihalotrin, bifentrin, fenvalerat, dan fluvalinat.

Sedangkan menurut keberadaan gugus *alpha-cyano*, Djojosumarto (2008) menjelaskan bahwa jenis piretroid dibagi menjadi 2 (dua) tipe :

1. Piretroid yang tidak mengandung gugus *alpha-cyano*

Yang termasuk tipe 1 ini adalah piretrin alami, alletrin, tetrametrin dan permetrin.

2. Piretroid yang mengandung gugus *alpha-cyano*

Yang termasuk tipe 2 ini adalah sipermetrin, deltametrin, fenvalerat dan fluvalinat.



2.2 Sipermetrin

2.2.1 Karakteristik Sipermetrin

Sipermetrin ditemukan pada tahun 1975. Insektisida non sistemik ini bekerja sebagai racun kontak dan racun perut. Sipermetrin digunakan pada sektor pertanian dan rumah tangga, kesehatan masyarakat dan kesehatan hewan.

Sipermetrin merupakan jenis piretroid tipe 2 yang memiliki kandungan α -cyano dan memiliki 8 stereoisomer (Djojsumarto, 2008).

Contoh sipermetrin yang beredar di pasaran ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Sipermetrin ((Kimia, 2015)

Menurut EPA (2006), Sipermetrin mempunyai sifat kimia dan sifat fisika sebagai berikut :

Rumus empiris : $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$

Komposisi : 8 stereoisomer

Warna : Coklat kekuningan

Berat molekul : 416,3

pH : 5

Nomor register CAS : 52315-07-8

Kode PC : 109702

Titik Leleh : 60 – 80 °C



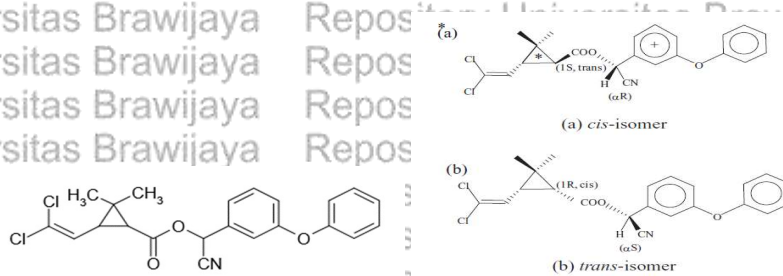
Titik Didih : 216 °C

Density : 1204 g/ml pada 25 EC

Tekanan uap : 3.1E-9 mm Hg pada 20 °C

Kelarutan dalam air : 7,6 ppb pada 25 °C log P

Struktur kimia sipermetrin pada gambar 2.2 :



Gambar 2.2. Struktur kimia sipermetrin (EPA, 2006 dan WHO, 2006)

2.2.2 Residu Sipermetrin

Residu sipermetrin adalah zat sipermetrin yang terkandung dalam hasil pertanian bahan pangan atau pakan hewan, baik penggunaan langsung maupun tidak langsung dari penggunaan sipermetrin. Residu ini meliputi senyawa hasil konversi, metabolit, senyawa hasil reaksi, dan zat pengotor yang bersifat toksik (Sakung, 2004). Menurut penelitian, komoditas pertanian di Indonesia yang mengandung residu sipermetrin adalah buah – buahan, sayuran, biji-bijian dan serelia (Kementan, 2015). Residu sipermetrin yang terbawa bersama makanan akan terakumulasi pada jaringan tubuh yang mengandung lemak (EPA, 2006).

Di Indonesia, permasalahan kimia keamanan pangan umumnya berkisar pada adanya peluang terjadinya kontaminasi dengan bahan berbahaya, seperti pestisida, residu obat hormon, mikotoksin dan kontaminan lainnya, oleh karena itu batas maksimum residu diperlukan untuk membatasi penggunaan bahan kimia yang berbahaya bagi makanan (Nursinah, 2014).



Pemerintah telah menetapkan batas maksimum residu pestisida pada makanan dan hewan. Batas maksimum residu (BMR) adalah salah satu indeks konsentrasi maksimum dari residu pestisida dalam satuan mg/kg yang direkomendasikan sebagai batasan yang diijinkan secara legal pada komoditas makanan dan daging hewan (Kementan, 2015).

Data BMR sipermetrin di Indonesia ditunjukkan pada tabel dibawah :

Tabel 2.1. Batas Maksimum Residu Sipermetrin Pada Makanan

| Nomor | Komoditas | BMR (mg/kg) |
|-------|---------------------|---------------|
| 1 | Anggur | 0,2 |
| 2 | Jeruk | 0,3 |
| 3 | Kelengkeng | 1 |
| 4 | Kismis | 0,5 |
| 5 | Leci | 2 |
| 6 | Mangga | 0,7 |
| 7 | Pepaya | 0,5 |
| 8 | Strawbery | 0,7 |
| 9 | Asparagus | 0,4 |
| 10 | Bawang Bombay | 0,01 |
| 11 | Bit | 0,1 |
| 12 | Cabai | 2 |
| 13 | Daun bawang | 0,05 |
| 14 | Jagung manis | 0,05 |
| 15 | Paprika | 0,1 |
| 16 | Okra | 0,5 |
| 17 | Tomat | 0,2 |
| 18 | Terong | 0,03 |
| 19 | Barley | 2 |
| 20 | Beras | 2 |
| 21 | Gandum | 2 |
| 22 | Oats | 2 |
| 23 | Biji kopi | 0,05 |
| 24 | Teh hijau/teh hitam | 15 |
| 25 | Timun | 0,2 |
| 26 | Jagung | 0,05 |

(Kementan, 2015)



2.2.3 Farmakokinetik Sipermetrin dalam Tubuh

Sipermetrin masuk kedalam tubuh melalui proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi.

1. Absorpsi

Proses absorpsi sipermetrin berada di saluran pencernaan. Tidak ada informasi mengenai mekanisme absorpsi sipermetrin didalam saluran pencernaan. Sipermetrin merupakan jenis piretroid sintetis yang lipofilik, sehingga sipermetrin diduga melalui sel intestinal dan masuk ke peredaran darah melalui difusi membran lipid. Absorpsi sebagian besar terjadi di saluran pencernaan karena memiliki permukaan yang besar. Sekitar 19 – 30 % sipermetrin yang terpapar secara oral dapat diabsorpsi oleh manusia (McCarthy *et al.* 2005 dan BPC, 2013).

2. Distribusi

Sipermetrin didistribusikan ke jaringan terdekat dan terakumulasi di jaringan yang memiliki kandungan lipid tinggi, seperti lemak, jaringan saraf pusat dan jaringan syaraf tepi. Sipermetrin terakumulasi di kulit dan beredar secara perlahan ke sistem peredaran darah (BPC, 2013).

3. Metabolisme

Sipermetrin dimetabolisme melalui hidrolisis ester, oksidasi dan konjugasi. Gugus alfa-cyano dari sipermetrin menurunkan laju pemecahan hidrolitik dari ikatan ester. Banyak trans-enansiomer dimetabolisme melalui pemecahan hidrolitik rangkaian ester dengan oksidasi berikutnya dan atau konjugasi komponen alkohol dan gugus asam, sedangkan cis enansiomer tertentu lebih tahan terhadap proses hidrolitik dan terdegradasi melalui oksidasi berbagai molekul.

Metabolisme sipermetrin melibatkan mikrosom carboxyesterase non spesifik dan mikrosom yang berfungsi oksidasi yang berlokasi di sekitar



jaringan. Enzim mikrosom berperan penting dalam proses metabolisme sipermetrin. Proses metabolisme sipermetrin terjadi didalam liver dan plasma (McCharty *et al.* 2005).

4. Eksresi

Sipermetrin diekskresi melalui urin, dan feses. Pada sebuah penelitian yang dilakukan pada 4 orang laki-laki yang diberi kapsul dosis tunggal 0,25 – 1,5 mg sipermetrin pada minyak jagung didapatkan hasil ekresi urine mengandung 3 – (2,2-dichlorovinyl)- 2,2 dimethylcyclopropanecarboxylic acid (DCVA) dan menunjukkan bahwa tidak ada isomerisasi *cis* dan *trans*. 78 % isomer *trans* dan 49 % isomer *cis* terekskresi secara bebas dan terkonjugasi DCVA.

Eliminasi sipermetrin terjadi setelah hari ke 5 terpapar dan beberapa isomer dapat menetap di dalam tubuh dalam jangka waktu yang lama.

Pada hewan mamalia, ekskresi sipermetrin juga terdeteksi pada air susu (ATSDR, 2003 dan WHO, 2006).

2.2.4 Biomarker Untuk Deteksi Sipermetrin

Biomarker merupakan sinyal indikator pada sistem biologi. Klasifikasi biomarker terdiri dari marker paparan, marker efek, dan marker gejala. Biomarker sipermetrin adalah dengan mengukur kadar urin dan plasma darah pada manusia yang terpapar sipermetrin. Sedangkan biomarker dari efek sipermetrin adalah adanya *paresthesia*, yaitu sensasi abnormal seperti terbakar, geli, gatal, mati rasa dan seperti ada yang menjalar pada kulit di tubuh. Sedangkan gejala yang dapat digunakan sebagai marker terpapar sipemetrin adalah pusing, sakit kepala, mual, pandangan kabur, dan rasa sesak di dada (ATSDR, 2003).



Metode analisis untuk mengukur paparan sipermetrin dapat menggunakan Gas kromatografi, *High Performance Liquid Chromatography* dan *Flame Photometric Detection* (ATSDR, 2003).

Satuan yang digunakan untuk menganalisis urin dan plasma darah menggunakan metode analisis tersebut dinyatakan dalam satuan mikrogram per liter (ATSDR, 2003).

2.2.5 Toksisitas Sipermetrin

Sipermetrin merupakan insektisida yang memiliki cara kerja mengganggu aliran Na^+ dalam sel syaraf, sehingga menyebabkan saluran natrium (*sodium channel*) selalu terbuka dan mengakibatkan *hyperexcitation* saraf. Saluran natrium berperan dalam penyebaran info potensial di sepanjang akson saraf (Hudayya, 2012). Mekanisme kerja sipermetrin sebagai neurotoxin ini berefek pada serangga dan mamalia (WHO, 2006). Uji toksisitas sipermetrin dapat dibagi menjadi uji toksisitas akut, sub kronik dan kronik. Pembagian ini berdasarkan lamanya paparan (WHO, 2006). Sipermetrin memiliki LD_{50} bervariasi yaitu antara 250 mg/KgBB – 4000 mg/KgBB pada tikus dan 80 mg/KgBB – 300 mg/KgBB pada mencit. LD_{50} sipermetrin yang bervariasi ini berdasarkan jenis pelarut yang digunakan (EPA, 2006). Sedangkan menurut Nagarjuna (2009), sipermetrin memiliki LD_{50} 205 mg/KgBB.

1. Toksisitas akut

Uji toksisitas akut adalah pemberian sediaan uji dengan dosis tunggal atau berulang dalam waktu tidak lebih dari 24 jam, apabila pemberian berulang maka pemberian dosis tidak boleh lebih dari 3 jam (BPOM, 2014). Pada penelitian Eraslan (2016), tikus yang dipapar sipermetrin dalam waktu 24 jam dengan dosis 80 mg/kgBB menunjukkan gejala



yang berkaitan dengan sistem saraf, yaitu tremor, *salivation*, *choreoaterosis*. Gejala ini muncul satu jam setelah pemberian dosis.

2. Toksisitas sub kronik

Uji toksisitas sub kronik adalah pemberian sediaan uji dengan dosis tunggal dalam waktu 28 hari atau 90 hari. Uji ini dimaksudkan untuk mengungkap berbagai efek berbahaya yang digunakan selama waktu tertentu serta menunjukkan apakah berbagai efek tersebut berkaitan dengan dosis (BPOM, 2014). Pada penelitian tikus yang dipapar sipermetrin dengan dosis 80 mg/kgBB selama 90 hari menunjukkan gejala *ataxia*, kerusakan sistem saraf pusat dan peningkatan lipid peroksidase (ATSDR, 2003).

3. Toksisitas kronik

Uji toksisitas kronik adalah pemberian sediaan uji dengan dengan waktu kurang dari 12 bulan. Pada toksisitas kronik, tikus menunjukkan dopamine *neurodegeneration*, kerusakan hepar dan peningkatan berat ginjal yang disebabkan karena peningkatan kadar urea dalam darah (BPOM, 2014).

2.2.6 Radikal Bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

1. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa atau molekul yang yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Jika elektron yang terikat oleh senyawa radikal bebas tersebut bersifat ionik, maka dampak yang timbul memang tidak berbahaya. Tetapi, bila elektron yang terikat radikal bebas berasal dari senyawa yang berkaitan



kovalen, akan sangat berbahaya karena ikatan digunakan secara bersama-sama pada orbital luarnya. Umumnya, senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul – molekul besar (biomakromolekul), seperti lipid, DNA dan protein (Winarsi, 2011).

Target kerusakan radikal bebas menurut Evan *et al.* (1991) :

a. Lipid

Radikal bebas dapat mengakibatkan lipid kehilangan ketidakefektifan, membentuk metabolit reaktif yang mengubah fluiditas, permeabilitas membran dan mempengaruhi enzim yang terikat membrane. Lipid tak jenuh merupakan target yang paling rentan karena banyak mengandung ikatan rangkap.

b. DNA dan RNA

Radikal bebas dapat memutus cincin deoksiribosa, menyebabkan kerusakan basa, terjadi mutasi, kesalahan translasi, dan menghambat sintesa protein.

c. Protein

Radikal bebas dapat menyerang protein, sehingga terjadi agregasi dan crosslinking, fragmentasi, modifikasi gugus thiol, menyebabkan perubahan transport ion, peningkatan influx kalsium dan perubahan aktivitas enzim.

Menurut Winarsi (2011), Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh ditunjukkan dengan rendahnya aktivitas enzim antioksidan dan tingginya kadar Malondialdehid dalam plasma.

Secara umum, pembentukan radikal bebas melalui tiga tahapan dibawah ini :

a. Tahap inisiasi, yaitu tahap awal pembentukan radikal bebas.

b. Tahap Propagasi, yaitu tahap pemanjangan rantai radikal.



c. Tahap Terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal bebas dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal, sehingga potensi propagasinya rendah.

2. *Reactive Oxygen Species (ROS)*

Reactive Oxygen Species adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas, dan kelompok nonradikal. Kelompok ROS yang merupakan radikal bebas antara lain *superoxide anion* ($O_2^{\bullet-}$), *hydroxyl radicals* ($OH \bullet$), dan *peroxyl radicals* (RO_2). Kelompok radikal yang merupakan nonradikal adalah *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* ($ROOH$). ROS adalah molekul yang tidak berpasangan, oleh karena itu sangat tidak stabil dan sangat reaktif. Kerusakan jaringan akibat serangan ROS dikenal dengan stress oksidatif, sedangkan faktor yang dapat melindungi jaringan terhadap ROS disebut antioksidan. Stres oksidatif dapat terjadi karena pengaruh lingkungan. Obat-obatan dan pestisida spektrum luas dapat menyebabkan oksidasi langsung senyawa biologi, sehingga merangsang terjadinya ROS. ROS berperan dalam proses seluler, tetapi tingginya tingkat ROS dapat memicu kerusakan sel, stress oksidatif, kerusakan DNA, dan apoptosis (Ray et al. 2013).

2.3 Apoptosis

2.3.1 Pengertian Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel terprogram melalui mekanisme genetik yaitu kerusakan/fragmentasi kromosom atau DNA (Sudiana, 2008).

Apoptosis merupakan kematian sel yang ditandai dengan kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA, sel yang menyusut, *blebbing* pada



membran plasma, dan pembentukan badan apoptosis yang mengandung inti sel atau material sitoplasma (Osthoff dan Schulze, 2008).

Jadi, menurut pengertian diatas, apoptosis merupakan kematian sel terprogram melalui mekanisme genetik yang ditandai dengan kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA, sel yang menyusut, *blebbing* pada membran plasma, dan pembentukan badan apoptosis yang mengandung inti sel atau material sitoplasma.

2.3.2 Fungsi Apoptosis

Fungsi apoptosis secara fisiologis adalah :

1. Terminasi sel

Apoptosis dapat terjadi pada sel yang mengalami kerusakan yang tidak dapat diperbaiki, infeksi virus dan adanya stress pada sel. Apoptosis melalui aktivasi jalur *p-53* dapat terjadi akibat adanya kerusakan DNA yang disebabkan karena ionisasi radiasi dan bahan kimia toksik (Raneehan, 2001).

2. Mempertahankan homeostasis

Jumlah sel dalam organ atau jaringan pada organisme dewasa harus berada pada keadaan lingkungan yang relatif konstan. Proses homeostasis diperlukan untuk menjaga keseimbangan lingkungan internal. Proses homeostasis ini terjadi jika pada jaringan terjadi keseimbangan antara proses proliferasi dan apoptosis (Lumongga, 2008).

3. Perkembangan embrional

Apoptosis merupakan bagian dari perkembangan jaringan. Pada masa embrio, perkembangan jaringan dan organ didahului dengan pembelahan sel dan diferensiasi sel kemudian dikoreksi dengan apoptosis (Lumongga, 2008).



4. Interaksi limfosit

Perkembangan limfosit B dan limfosit T pada tubuh manusia merupakan suatu proses yang kompleks dan terjadi apoptosis pada sel yang berpotensi rusak (Elmore, 2007).

5. Involusi hormonal pada usia dewasa

Apoptosis dapat terjadi pada sel endometrium saat siklus menstruasi, regresi payudara setelah masa menyusui dan atresi folikel ovarium (Elmore, 2007).

2.3.3 Jenis Apoptosis

Apoptosis dibagi menjadi dua kelompok, yaitu :

1. Apoptosis fisiologis

Apoptosis fisiologis adalah kematian sel yang diprogram (*Programmed Cell Death*). Proses kematian sel ini berkaitan dengan enzim telomerase. Pada sel embrional, enzim ini mengalami aktivasi, sedangkan pada sel somatik, enzim ini tidak mengalami aktivasi, kecuali sel yang bersangkutan mengalami transformasi menjadi ganas (Raneehan, 2001).

2. Apoptosis Patologis

Apoptosis patologis adalah kematian sel yang terjadi karena suatu rangsangan / jejas. Proses apoptosis patologis ini dapat terjadi melalui beberapa jalur, yaitu:

a. Aktivitas p-53

Apoptosis yang disebabkan karena aktivitas p-53 disebabkan karena sel tersebut memiliki gen yang cacat (defek). Kecacatan gen dalam suatu sel disebabkan karena bahan kimia, radikal bebas maupun virus (*oncovirus*). Gen yang cacat dapat memicu aktivitas beberapa enzim seperti PKC2 dan CPK –K2 lalu



kedua enzim ini dapat memicu aktivitas p-53. Gen p-53 merupakan faktor transkripsi p-21. Apabila terjadi peningkatan p21, maka semua CDK akan ditekan pada semua siklus sel. Dengan adanya penekanan CDK pada semua siklus sel, maka siklus sel akan berhenti. Saat siklus sel berhenti, p-53 akan memicu aktivitas BAX dan menekan aktivitas BCL-2 pada membran mitokondria, sehingga terjadi perubahan permeabilitas dari membran mitokondria. Perubahan ini mengakibatkan terjadi pelepasan *cytokrom-c* ke sitosol. Di sitosol, *cytokrom-c* akan mengaktifasi Apaf-1 yang selanjutnya akan mengaktifasi kaskade caspase dan caspase ini akan mengaktifkan DNA-se. Kemudian DNA sel yang bersangkutan mengalami fragmentasi dan akhirnya sel mengalami apoptosis (Sudiana, 2008).

b. Jalur sitotoksik

Terjadinya apoptosis pada jalur sitotoksik ini dipicu oleh adanya sel yang mengalami cacat gen. Dengan adanya kecacatan sel ini, maka sel tersebut akan mengekspresikan protein asing. Protein asing yang dihasilkan bersifat imunogenik, sehingga memicu terjadinya proses pembentukan antibody. Antibodi yang terbentuk akan menempel di permukaan sel tertentu. Hal ini terjadi karena adanya beberapa sel yang membrannya memiliki *FC reseptor* dari antibody, antara lain *sel killer*. Dengan adanya reseptor tersebut, maka antibodi akan menempel di permukaan *sel killer*. Selanjutnya antibodi yang berada di permukaan sel killer akan mengikat protein asing yang berada di permukaan sel yang mengalami cacat. Adanya ikatan sel killer tersebut akan melepaskan suatu enzim yang disebut sitotoksin.



Sitotoksin akan dilepas oleh sel killer tersebut mengandung perforin dan *granzyme* yang berada di dalam sitosolik dari sel yang mengalami gen cacat tersebut akan mengaktifasi kaskade caspase. Selanjutnya, caspase yang aktif ini mengaktifasi DNA-se. DNA-se inilah yang merusak DNA yang berada didalam inti, sehingga sel mengalami apoptosis (Sudiana, 2008).

c. Disfungsi mitokondria

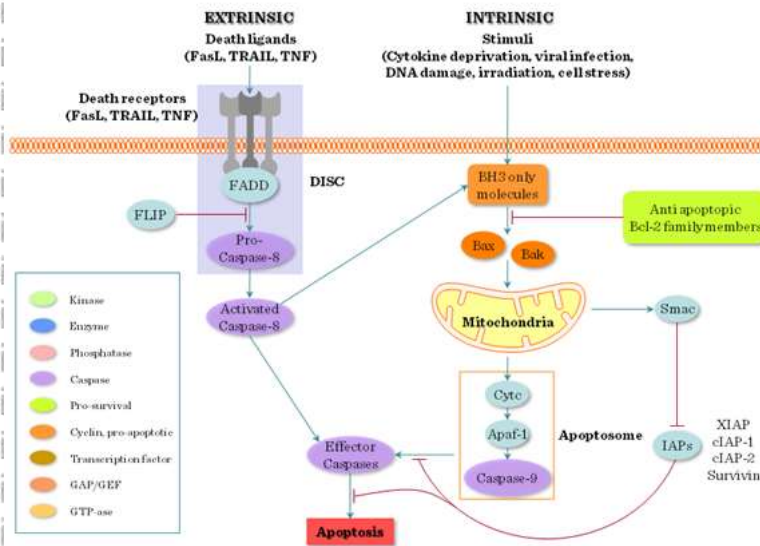
Yang dimaksud disfungsi mitokondria adalah gangguan ekspresi protein pada mitokondria yang tidak seimbang baik ekspresinya yang berlebihan atau protein yang diekspresikan merupakan protein abnormal (Zeiss, 2003).

d. Kompleks fas dan ligan.

Terjadinya apoptosis melalui jalur fas dan ligan dapat terjadi karena dipicu oleh adanya sel tumor atau gangguan hormonal (Zeiss, 2003).

2.3.4 Mekanisme Apoptosis

Apoptosis terjadi melalui 2 jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik melibatkan *death receptor* yang berperan penting dalam homeostasis jaringan, sedangkan jalur intrinsik melibatkan mitokondria untuk memberikan respon terhadap isyarat ekstraseluler dan kerusakan DNA (Osthoff dan Schulze, 2008). Berikut ini gambar mekanisme apoptosis melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik :



Gambar 2.3 Mekanisme apoptosis melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik (Berki *et al*, 2011).

Berdasarkan gambar 2.3, maka mekanisme jalur apoptosis adalah :

1. Jalur ekstrinsik

Jalur ekstrinsik diinisiasi oleh ikatan *death receptor* pada permukaan berbagai sel. TNF adalah molekul penginduksi interseluler yang berupa asam amino-157, dihasilkan terutama oleh makrofag yang teraktivasi, merupakan mediator apoptosis ekstrinsik utama. Ada 2 macam reseptor untuk TNF yaitu TNFR-1 dan TNFR-2. TNF yang berikatan dengan TNFR-1 yang dapat menginisiasi jalur aktivasi caspase. Fas (Apo-1 atau CD 95) adalah reseptor untuk sinyal apoptosis ekstrinsik lain pada membrane sel, dan termasuk family reseptor TNF (Berki *et al*, 2011).

2. Jalur intrinsik

Pathway ini terjadi karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro apoptosis kedalam sitoplasma tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis BCL2, yang



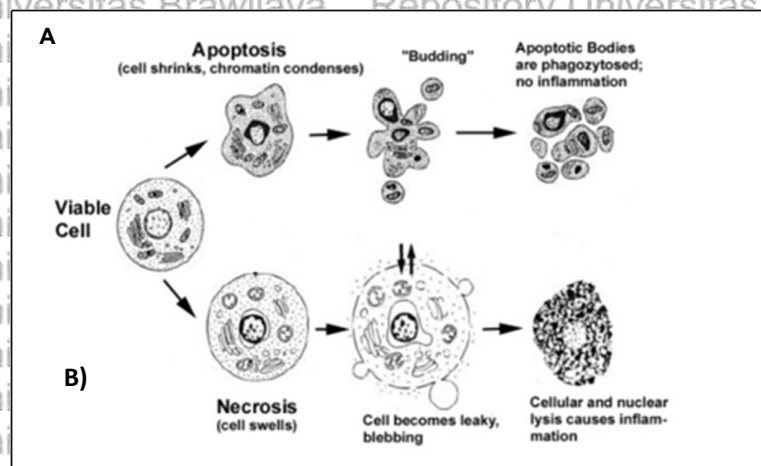
berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein utama apoptosis ada didalam membrane mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, BCL2 dan BCL-X menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan protein proapoptosis, seperti Bax, Bak dan Bim. Sewaktu kadar BCL menurun, permeabilitas membrane mitokondria meningkat. Beberapa protein dapat mengaktifkan cascade caspase. Salah satu protein tersebut adalah citokrom c yang diperlukan untuk respirasi pada mitokondria. Didalam sitosol, citokrom c berikatan dengan Apaf-1 dan mengaktifasi caspase 9. Protein mitokondria lainnya seperti Aif memasuki sitoplasma dengan inhibitor pada keadaan normal untuk menghambat aktivasi caspase (Elmore, 2007 dan Rastogi *et al.* 2009).

2.3.5 Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

Apoptosis merupakan dual hal yang berbeda. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram sedangkan nekrosis merupakan kematian sel pada organisme hidup yang terjadi karena infeksi atau perlukaan. (Rastogi *et al.*, 2009).



Perbedaan apoptosis dan nekrosis ditunjukkan pada gambar 2.4 berikut :



Gambar 2.4 Perbedaan nekrosis dan apoptosis

Keterangan : A) Apoptosis memiliki perubahan morfologi bentuk bentuk sel menyusut, kromatin mengalami kondensasi dan *margination* pada *nuclear periphery* dan membentuk *apoptotic bodies* yang mengandung organella B) Nekrosis ditandai sel membesar, terbentuk tonjolan kecil, struktur nukleus berubah, Tonjolan sitoplasma bergabung dan menjadi besar, Organella tidak berada di tonjolan sitoplasma sel membrane ruptur dan mengeluarkan isi sel, Organel tidak berfungsi (Van Cruchten dan Van den Broeck, 2002).

Berdasarkan gambar 2.4 diatas, maka apoptosis memiliki perubahan morfologi bentuk sel menyusut, kromatin mengalami kondensasi, dan *margination* pada *nuclear periphery* dan membentuk *apoptotic body*. Sedangkan nekrosis ditandai dengan sel yang membesar, terbentuk tonjolan kecil, struktur nucleus berubah, tonjolan sitoplasma bergabung menjadi besar dan sel membran ruptur serta tidak mengeluarkan isi sel (Van Chruchten dan Van den Broeck, 2002).



Perbedaan apoptosis dan nekrosis berdasarkan gambaran morfologi, biokimia dan fisiologi dijelaskan pada tabel 2.2 di bawah ini.

Tabel 2.2 Perbedaan apoptosis dan nekrosis

| Profil | Apoptosis | Nekrosis |
|--------------------|--|---|
| Gambaran Morfologi | Membran tonjolan sitoplasma (blebbing) Dimulai dengan penyusutan dan Kondensasi kromatin Agregasi kromatin di membrane nucleus Mitochondria dipertahankan struktur normal dan permeabilitas membran luar Diakhiri dengan fragmentasi DNA | Kehilangan integritas membrane Dimulai dengan sitoplasma dan mitokondria yang membengkak Tidak ada kondensasi kromatin Disintegrasi organel Diakhiri dengan lysis nya sel |
| Gambaran biokimia | Pengaturan melibatkan enzim dan mediator Tergantung ATP Fragmentasi DNA non acak Pengeluaran protein mitokondria apoptogenik (cytochro c,AIF) Aktivasi jalur caspase | Kehilangan homeostasis Tidak membutuhkan energy Digesti acak DNA Stres oksidatif, kelebihan kalsium, penurunan ATP Aktivasi kalsium dependent protease |
| Gambaran fisiologi | Kehilangan asimetri membrane Menghilangkan kerusakan, tranformasi, sel terinfeksi, berfungsi pada perkembangan organ dan respon imun Dipicu oleh <i>death ligand</i> , penurunan growth factor, stress sel yang berbeda | Peran fisiologinya tidak jelas, sebagai mekanisme cadangan bila terjadi kegagalan apoptosis Dipicu oleh perlukaan |
| | Fagosit oleh sel yang berdekatan atau makrofag Tidak ada respon inflamasi | Difagosit oleh makrofag Terdapat respon inflamasi yang parah |

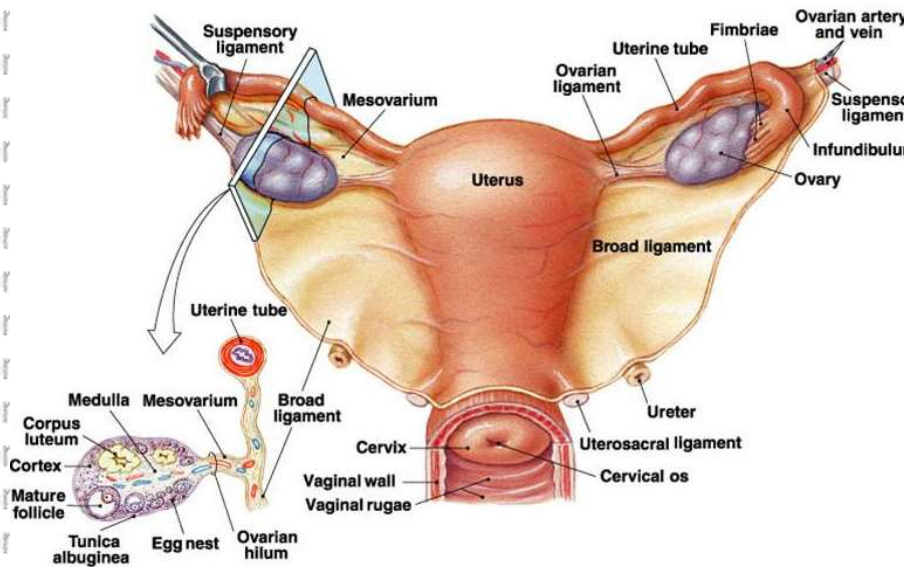
Sumber : (Osthoff dan Schulze, 2008)



2.4 Folikel Ovarium

2.4.1 Anatomi, Morfologi, dan Histologi Ovarium

Menurut Manuaba (2007), organ genitalia interna wanita terdiri dari vagina, uterus, tuba falopii dan ovarium. Berikut ini gambar anatomi reproduksi wanita.

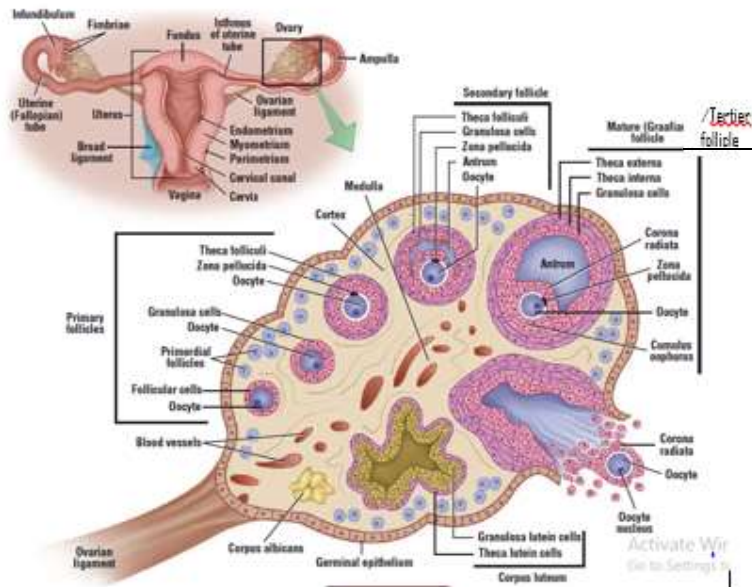


Gambar 2.5 Anatomi organ reproduksi wanita (Marieb, 2003)

Berdasarkan gambar 2.5, Ovarium merupakan organ yang berbentuk menyerupai almond yang memiliki dua struktur kecil berbentuk oval, masing – masing berukuran 2 x 4 x 1,5 cm, berada jauh didalam pelvis wanita sedikit lateral dan di belakang uterus. Kedua organ ini terikat lemah pada uterus oleh pita jaringan ikat (Heffner dan Schust, 2010). Ovarium berfungsi untuk perkembangan dan pelepasan ovum serta sintesis hormon estrogen dan progesteron. Ovarium tersusun menjadi dua bagian, yaitu bagian korteks (bagian luar) dan medulla (bagian tengah). Bagian korteks diliputi epitel germinativum berbentuk kubus dan didalamnya terdapat stroma, jaringan ikat dan folikel primordial. Sedangkan bagian medulla



tersusun dari stroma yang lebih longgar, otot polos, pembuluh darah dan serat saraf. Tiap ovarium dikelilingi oleh kapsul fibrosa yang disebut *tunika albuginea* (Manuaba, 2007). Berikut di bawah ini gambar folikel ovarium.



Gambar 2.6 Folikel ovarium pada wanita dewasa

Keterangan: Bagian folikel dan luteal tampak pada korteks dan pembuluh darah dan saraf tampak didalam medulla (Eroschenko, 2008)

Berdasarkan gambar 2.6, anatomi ovarium terdiri dari lapisan korteks bagian luar yang tidak berbatas tegas dengan medulla di bagian tengahnya. Medula ovarium terdiri dari jaringan ikat yang berisi sedikit pembuluh darah besar yang berkelok – kelok, pembuluh limfe dan saraf dikarenakan medulla berhubungan langsung dengan hilus. Korteks ovarium terdiri atas jaringan stroma yang mengandung banyak sel yang didalamnya mengandung folikel ovarium. Sel stroma korteks membentuk suatu kapsul yang memanjang disebut *tunika albuginea* yang terletak di bawah membran basal dari epitel germinativum (Coad dan Dunstall, 2011).



2.4.2 Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan proses pertumbuhan dan perkembangan folikel primordial menjadi folikel de graff (Look *et al.* 2011).

Folikulogenesis pada wanita membutuhkan waktu satu tahun agar folikel primordial bisa tumbuh dan berkembang ke tahap ovulasi. Pertumbuhan folikel ditandai dengan adanya proliferasi sel dan pembentukan cairan folikel, sedangkan perkembangan ditandai dengan adanya *cytodifferentiation* semua sel dan jaringan dalam folikel (Melmed *et al.* 2016). Hanya beberapa folikel ovarium wanita yang dapat bertahan sampai tahap *cytodifferentiation* dan sisanya akan mengalami apoptosis. Pertumbuhan dan perkembangan folikel dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi ligan (hormon dan *growth factor*), sedangkan pada faktor endokrin dipengaruhi oleh sistem saraf pusat, hipofise anterior dan mekanisme jalur ovarium (Chonti and Chang, 2010)

Folikulogenesis diawali diambilnya folikel primordial kedalam suatu kumpulan yang berisi folikel yang sedang tumbuh berkembang dan dapat diakhiri baik dengan ovulasi atau mati menjadi atresia (Gold *et al.* 2011).

Fase folikulogenesis dibagi menjadi dua yaitu :

1. Fase Preantral atau fase gonadotropin independen

Fase preantral adalah fase dimulainya aktivitas folikel primordial , bertransisi menjadi folikel primer hingga menjadi folikel sekunder. Pada fase ini ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi dari oosit. Pada fase preantral, pertumbuhan dan perkembangan folikel tidak dipengaruhi oleh gonadotropin. Fase preantral atau fase kelas 1 dibagi menjadi 3 stadium utama: stadium folikel primordial, primer, dan sekunder (Jameson dan Groot, 2010).



2. Fase Antral atau fase gonadotropin dependen

Pada fase antral ditandai dengan peningkatan pesat dari ukuran folikel itu sendiri (sampai kira-kira 25 mm). Fase antral adalah fase dimana antrum mulai terbentuk. Pada fase ini terbentuk folikel tersier atau folikel de graf.

Fase antral diatur oleh *Follicle Stimulating Hormone (FSH)* dan *Luteinizing Hormone (LH)*, serta faktor-faktor pertumbuhan lainnya (Levy et al. 2006).

Faktor-faktor pertumbuhan ini akan merangsang proliferasi sel dan mempengaruhi aktivitas gonadotropin. Fase antral umumnya dibagi menjadi empat stadium: folikel kecil (kelas 2, 3, 4, 5), sedang (kelas 6), besar (kelas 7), dan preovulasi (kelas 8) stadium folikel Graaf. Setelah pembentukan antrum pada saat stadium kelas 3 (diameter ~0.4mm), laju pertumbuhan folikuler meningkat cepat (Erickson, 2008).

Tahapan folikulogenesis terdiri dari empat tingkatan, yaitu :

1. Pengambilan folikel dominan (Rekrutmen).

Rekrutmen folikel dominan diawali dengan dipilihnya folikel primordial ke dalam folikel yang sedang berkembang. Folikel primordial merupakan folikel terpenting dalam reproduksi karena folikel ini merupakan cikal bakal perkembangan folikel menjadi folikel dominan yang akan berovulasi atau atresia. Proses perubahan folikel primordial menjadi folikel primer disebut rekrutmen / proses pengambilan (Coad dan Dunstall, 2011).

2. Perkembangan Folikel Antral.

Pada fase ini dibagi menjadi empat tahap, yaitu folikel kecil (kelas 2,3,4 dan 5), sedang (kelas 6), besar (kelas 7), dan preovulasi (kelas 8). Pembentukan antrum dimulai pada folikel kelas 3 dengan diameter 0,4 mm (Strauss, 2013).



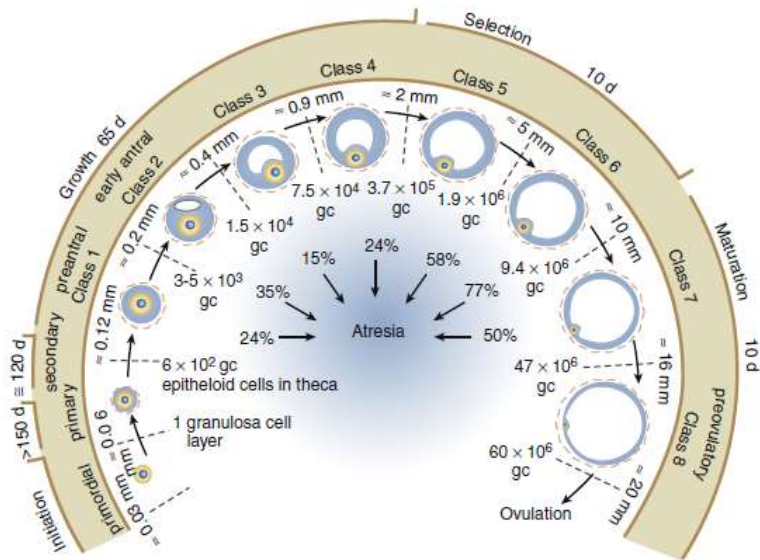
3. Seleksi dan Pertumbuhan Folikel Graff.

Seleksi merupakan hal terpenting dalam folikulogenesis karena pada fase ini terjadi proses penyeleksian folikel. Folikel yang dipilih adalah folikel sehat berukuran 2 – 5 mm. Folikel dipilih dari sekumpulan folikel kelas 5 di akhir fase luteal siklus menstruasi (Conti dan Chang, 2010).

4. Atresia Folikel.

Sebagian folikel ovarium yang mengalami degeneratif disebut atresia. Sel folikel dan oositnya mati karena dimakan oleh sel fagositik. Proses atresia melibatkan apoptosis, luruhnya sel granulosa, autolysis oosit dan berkurangnya zona pelusida (Townson dan Combelles, 2012).

Berikut ini gambar tahapan folikulogenesis pada ovarium wanita:



Gambar 2.7 Tahapan folikulogenesis dalam ovarium

Keterangan: gc: granulosa cell; d: day. Perkembangan folikel ovarium dibagi menjadi 8 kelas. Pembagian kelas berdasarkan pada jumlah lapisan granulosa yang mengelilingi folikel (Strauss dan Berbiery, 2013).



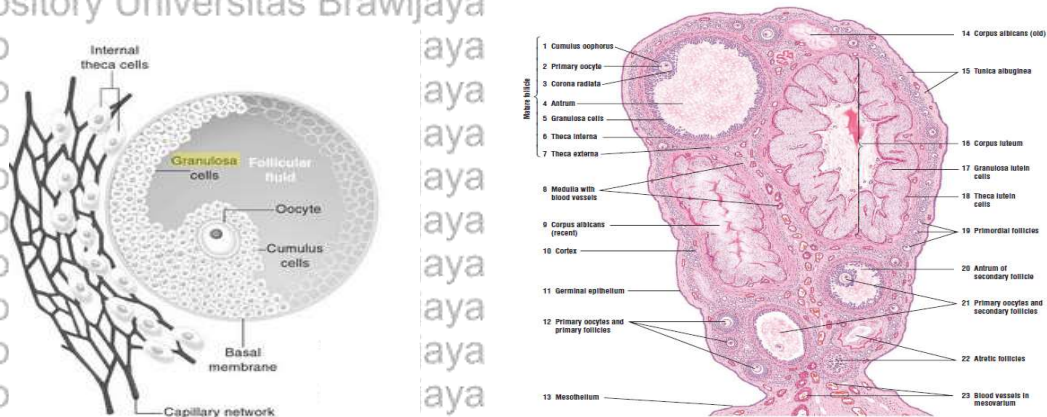
Berdasarkan gambar 2.7, maka kelas 1 merupakan periode preantral atau gonadotropin independen. Dibutuhkan kira-kira 290 hari untuk mengambil folikel dominan dan tumbuh menjadi folikel sekunder yang tumbuh sempurna (Geugeon, 2010). Kelas 2-8 merupakan periode antral (Graaf) atau gonadotropin-dependen. Dari mulai kavitas atau permulaan pembentukan antrum, dibutuhkan waktu kira-kira 60 hari untuk melewati stadium-stadium folikel kecil (kelas 2-4), medium (kelas 5, 6) dan besar (kelas 7) dan preovulasi (kelas 8) stadium folikel Graaf (Look, 2011). Setelah terseleksi, biasanya dibutuhkan waktu kira-kira 20 hari untuk folikel dominan dalam mencapai stadium ovulasi. Atresia dapat terjadi pada fase preantral maupun antral, tetapi angka kejadian atresia terbesar dapat terjadi pada fase antral, yaitu lebih dari 2 mm (Becker, 2001, Strauss, 2013). Folikulogenesis terjadi di korteks ovarium. Ukuran folikel di korteks menunjukkan berbagai tahapan folikulogenesis. Tujuan dari folikulogenesis adalah menghasilkan folikel dominan dan akhirnya hanya satu folikel dominan yang akan tumbuh pesat mencapai diameter 20 milimeter dan menjadi folikel preovulasi (Heffner dan Schust, 2008).



2.4.3 Sel Granulosa

2.4.3.1 Pertumbuhan dan Perkembangan Sel Granulosa

Sel granulosa merupakan sel di ovarium yang mengekspresikan reseptor FSH (Look, 2011). Berikut ini menunjukkan gambar sel granulosa pada sel folikel tersier.



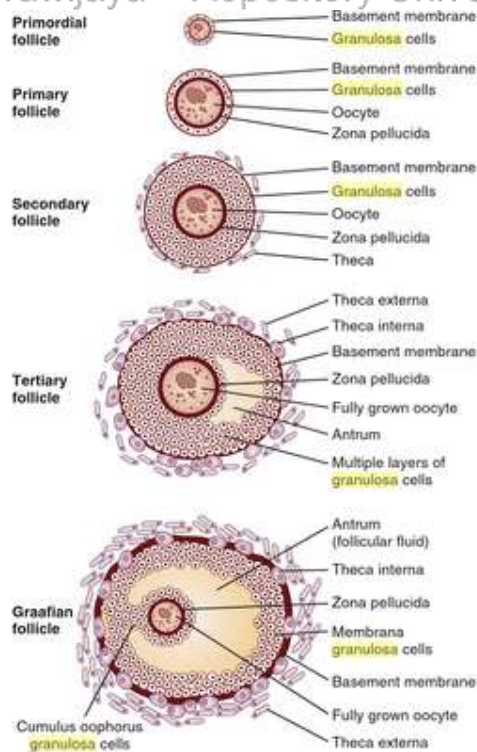
Gambar 2.8 Sel granulosa pada folikel tersier (Eroschenko, 2008 dan Look, 2011)

Berdasarkan gambar 2.8, maka sel granulosa terletak pada membran basalis yang memisahkan sel ini dari sel stroma di sekitarnya (Sadler, 2009). Sel granulosa terbentuk ketika oosit primer mulai tumbuh dimana sel – sel sekitar berubah dari kuboid menjadi gepeng dan berproliferasi. Perubahan bentuk sel granulosa ini sebagai petanda awal pertumbuhan folikel (Heffner dan Schust, 2008).

Sel granulosa menerima pasokan darah secara tidak langsung karena basal lamina memisahkan sel granulosa dari vaskularisasi teka interna. Dengan tidak adanya pasokan darah, maka sel granulosa membutuhkan komunikasi intraseluler dengan oosit (Strauss dan Berbiery, 2013).



Berikut ini gambar pertumbuhan dan perkembangan sel granulosa berdasarkan fase pertumbuhan folikel.



Gambar 2.9 Pertumbuhan dan perkembangan folikel dan sel granulosa (Melmed *et al.* 2016).

Berdasarkan gambar 2.9, klasifikasi folikel serta pertumbuhan dan perkembangan sel granulosa pada ovarium wanita dewasa terdiri dari

4 kategori, yaitu :

1. Folikel primordial.

Pada folikel primordial terdiri dari satu lapisan sel granulosa bentuk sel kuboid (kurang dari 10 sel), memiliki karakteristik ovarium imatur (~30 mikron) tanpa zona pelusida. Memiliki diameter folikel < 40 mikron

(Dahari *et al.* 2016).



2. Folikel primer

Pada folikel primer terdiri dari satu atau dua lapisan sel granulosa bentuk sel kuboid (10 – 40 sel), memiliki karakteristik ovarium imatur (25 – 45 mikron), zona pelusida sedikit. Dikelilingi mitokondria, badan golgi pada daerah *cortical* oosit (Townson dan Combelles, 2012).

3. Folikel sekunder.

Pada Folikel sekunder terdiri dari dua sampai enam lapisan sel granulosa bentuk sel kuboid (40 – 250 sel), memiliki karakteristik oosit matur (35 – 75 mikron), zona pelusida sedikit (Coron dan Boulpaep, 2012).

4. Folikel tersier.

Pada folikel tersier memiliki lebih dari enam lapisan lapisan sel granulosa dengan bentuk sel kuboid (> 250 sel), memiliki karakteristik oosit matur (100 – 150 mikron) dengan zona pelusida yang sudah terbentuk sepenuhnya dikelilingi *cumulus oophorus* (Coad, 2011).

Menurut Boron dan Baulpaep (2012), tipe sel granulosa menurut pada folikel sekunder atau tersier terdiri dari 3 tipe, yaitu :

1. Sel granulosa mural, yaitu sel granulosa yang letaknya paling jauh dari tengah folikel dan paling aktif secara metabolik karena mengandung sejumlah besar reseptor LH dan enzim yang diperlukan untuk sintesis steroid.
2. Sel granulosa kumulus, yaitu sel granulosa yang letaknya dekat dengan oosit saat ovulasi.
3. Sel granulosa yang berhadapan dengan antrum, yaitu sel granulosa yang berhadapan dengan antrum yang tertinggal didalam folikel menjadi sel luteal besar korpus luteum.



2.4.3.2 Peran Sel Granulosa Dalam Regulasi Ovarium

Sel granulosa pada masa preovulatory menghasilkan estradiol yang merupakan hormon primer steroid. Fungsi utama sel granulosa adalah memproduksi steroid dan sejumlah faktor pertumbuhan untuk berinteraksi dengan oosit selama perkembangannya dalam folikel ovarium (Panghiyngani *et al.*, 2013 dan Melmed *et al.* 2016).

2.4.3.3 Jumlah Sel Granulosa Berdasarkan Perkembangan Folikel

Pada folikel ovarium dibagi menjadi 8 kelas berdasarkan jumlah sel granulosa tiap folikel (Gougeon, 2010). Tabel dibawah ini menunjukkan pembagian kelas folikel dan jumlah sel granulosa.

Tabel 2.3 Pembagian kelas folikel dan jumlah sel granulosa

| Kelas Folikel | Jumlah Sel Granulosa | Karakteristik morfologi |
|---------------|---|-------------------------|
| 1 | $0,6 \times 10^3$ sampai 3×10^3 | Tidak ada antrum |
| 2 | 3×10^3 sampai 15×10^3 | Terbentuk antrum |
| 3 | 15×10^3 sampai 75×10^3 | Antrum kecil |
| 4 | 75×10^3 sampai 375×10^3 | Antrum sedang |
| 5 | 375×10^3 sampai $1,87 \times 10^6$ | Antrum sedang |
| 6 | $1,87 \times 10^6$ sampai $9,4 \times 10^6$ | Antrum sedang |
| 7 | $9,4 \times 10^6$ sampai 47×10^6 | Antrum besar |
| 8 | $> 47 \times 10^6$ | Preovulatory |

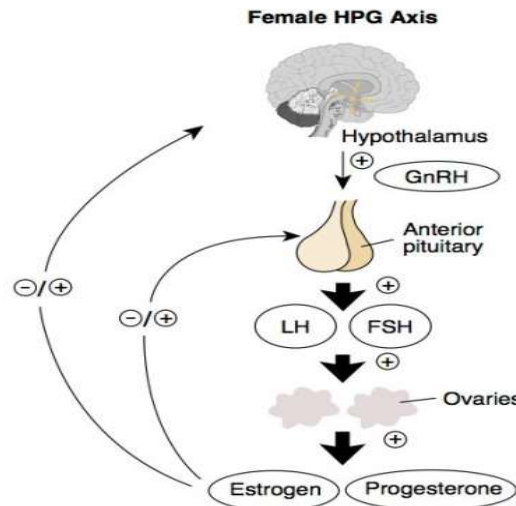
(Gougeon, 2010)

Berdasarkan tabel 2.3, maka folikel kelas 1 merupakan fase yang tidak tergantung GnRH untuk pertumbuhan dan perkembangan folikel dan sel granulosa. Sedangkan folikel kelas 2 – 8 merupakan fase yang tergantung GnRH untuk pertumbuhan dan perkembangan folikel dan sel granulosa (Ghumman, 2015).



2.4.4 Mekanisme Hipotalamus – Pituitari – Gonadal (HPG) Axis

Perkembangan folikel dipengaruhi oleh Hipotalamus – pituitary – gonadal axis. Berikut ini digambarkan mekanisme HPG-axis :



Gambar 2.10 Hipotalamus – Pituitary – Gonadal Axis (Hill, 2017)

Berdasarkan gambar 2.10 dijelaskan bahwa Pada siklus ovarium diawali dengan hipotalamus dalam sistem saraf pusat mengeluarkan *Gonadotropin Releasing hormone* (GnRH), kemudian GnRH merangsang kelenjar pituitary anterior untuk mengeluarkan hormon FSH dan LH (Heffner dan Schust, 2010). Hormon FSH menyebabkan sekitar 20 sel telur tumbuh dan matang di ovarium. Umumnya satu folikel atau lebih dari satu folikel berkembang menjadi folikel de graff dan folikel lainnya mengalami atresia (Geugeon, 2010). Folikel de graff kemudian memproduksi estrogen. Oleh karena itu, dalam awal siklus kadar estrogen meningkat. Estrogen ini kemudian menyebabkan umpan balik negatif, yaitu dengan menekan produksi FSH, tetapi menyebabkan umpan balik positif pada LH, sehingga lobus anterior hipofise dapat mengeluarkan hormon gonadotropin kedua yakni LH. Oleh karena itu, saat estrogen meningkat terjadi LH surge yang menyebabkan ovulasi (Hayes *et al.*, 2004).



2.4.5 Mekanisme Pestisida sebagai *Endocrine Disruptor*

Menurut (Bretveld *et al.*, 2006) Pestisida dapat menurunkan tingkat kesuburan wanita dengan cara mengganggu keseimbangan fungsi sistem endokrin wanita. Ketidak seimbangan fungsi sistem endokrin yang disebabkan pestisida dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu:

1. Mengganggu sintesis hormon

Semua hormon memiliki struktur kimia dan rute perjalanan yang berbeda dalam tubuh. Jika salah satu substansi atau *link* terganggu dalam sistesis hormon, maka hormon tidak dapat diproduksi atau memiliki sifat yang berbeda (Vingard *et al.* 2000).

2. Mempengaruhi penyimpanan dan pengeluaran hormon

Hormon katekolamin (norepinefrin) disimpan di sel kromomaffin *granular vesicle* dalam medulla adrenal dan didalam *ujung synaps* sistem saraf pusat. Hormon katekolamin dikeluarkan berdasarkan kebutuhan tubuh. Sedangkan hormone steroid, tidak disimpan didalam sel, melainkan disintesis setelah adanya rangsangan dari gonadotropin. Beberapa pestisida dapat menghambat pengikatan norepinefrin dengan alpha 2-andrenoreseptor. Norepinefrin diperlukan untuk meneruskan rangsangan GnRH. Apabila tidak ada rangsangan GnRH, maka LH tidak terbentuk (Bretveld *et al.*, 2006)

3. Mengacaukan transport hormon

Steroid hormon membutuhkan protein pengikat (seperti *sex hormone binding globulin* dan albumin) agar dapat beredar di aliran darah. Beberapa pestisida dapat meningkatkan dan menurunkan *sex hormone binding globulin*, sehingga dapat mempengaruhi jumlah hormon dalam darah (Crisp *et al.* 1998).



4. Mengacaukan ikatan dan pengenalan reseptor

Hormon dapat sampai ke jaringan harus bertemu dengan reseptor yang sesuai. Beberapa pestisida dapat mempengaruhi ikatan dan pengenalan reseptor. Menurut (Bretveld *et al.*, 2006), pestisida jenis DDT, methoxychlor, dieldrin dan endosulfandaoat bersifat pro estrogenic sehingga dapat berikatan dan mengaktifkan estrogen reseptor. Pestida ini mengacaukan sistem endokrin dengan cara memiliki sifat seperti 17β - estradiol, sehingga bersifat agonist dengan estrogen (Bretveld *et al.*, 2006).

5. Mempengaruhi sistem saraf pusat

Sistem saraf pusat sangat penting dalam mengintegrasikan sistem hormon dan aktivitas perilaku. Gangguan pada sistem saraf pusat dapat mengganggu perilaku adaptif normal dan mekanisme sistem reproduksi. Beberapa pestisida memiliki efek neurotoksik yang dapat merusak koordinasi sistem saraf pusat dengan cara merusak fungsi sel otak. Pestisida juga dapat mengganggu fungsi hipotalamus dan pituitary dalam mensekresi GnRH, FSH dan LH dengan cara mengganggu umpan balik hormon endogen (Bretveld *et al.*, 2006).

2.4.6 Mekanisme Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa dan Indeks Apoptosis Sel Granulosa

1. Sipermetrin menyebabkan apoptosis sel granulosa yang diinduksi

Reactive Oxygen Species (ROS).

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram. Salah satu jalur apoptosis adalah melalui jalur intrinsik yang melibatkan mitokondria. ROS dikenal sebagai pemicu jalur apoptosis intrinsik melalui interaksi dengan protein di luar membran mitokondria (Tebourbi *et al.* 2011).



Di dalam sel, *reactive oxygen species* (ROS) diproduksi secara terus menerus sebagai reaksi biokimia. Apabila produksi ROS dan radikal bebas melebihi kapasitas penangkapan oleh antioksidan, maka akan menimbulkan keadaan stress oksidatif. Adanya stress oksidatif akan merusak lipid seluler, protein maupun DNA dan menghambat fungsi normal sel (Kohen dan Nyska, 2002). Sipermetrin memiliki sifat lipofilik dan memiliki ukuran molekul kecil, sehingga mampu melewati membran sel dan mencapai nucleus. Di dalam nukleus, sipermetrin berikatan dengan DNA melalui reaksi sebagian asam yang memicu DNA menjadi tidak stabil, sehingga DNA lepas. Hal ini yang menyebabkan kerusakan gen (Hussien *et al.* 2011).

Isomer *cis* dalam sipermetrin merupakan jenis enantiomer yang aktif secara biologi, sehingga isomer *cis* lebih mudah mengalami reaksi metabolisme secara hidrolisis dan oksidasi. Selama metabolisme, sipermetrin membentuk *cyanohydrines* kemudian terurai menjadi sianida dan aldehid. Substansi sianida dan aldehid dapat dalam sipermetrin ini merupakan radikal bebas yang mampu menginduksi terjadinya ROS, sehingga meningkatkan *lipid peroxidation* dan penurunan enzim antioksidan yaitu SOD, CAT, GST, dan GPx (Wielgomas, 2007). Akibat adanya peningkatan ROS, maka dapat menimbulkan stres oksidatif pada sel (Devine, 2012). Dengan adanya stress oksidatif, maka mengubah permeabilitas membran mitokondria dan membuka pori mitokondria dan mengeluarkan protein sitokrom c (Saelens *et al.* 2004). Sitokrom c ini berikatan dengan apaf-1 kemudian mengaktifasi caspase 9. Selanjutnya, caspase 9 mengaktifasi caspase 3. Apabila caspase 3 sudah teraktifasi, maka apoptosis terjadi (Elmore, 2007).



Sipermetrin memiliki sifat lipofilik dan memiliki ukuran kecil, sehingga mampu menembus sel granulosa dalam ovarium dan terakumulasi di dalam ovarium. Adanya *xenobiotic* dalam ovarium dalam jumlah besar dapat menginduksi terjadinya ROS (Molavi *et al.*, 2014). Peningkatan ROS di ovarium dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel granulosa yang ditandai dengan penurunan antioksidan. Hal ini memicu peningkatan indeks apoptosis di sel granulosa (Gabbianelli, 2004).

2. Sipermetrin dapat menurunkan jumlah sel granulosa pada folikel tersier dengan merusak sistem saraf di hipotalamus.

Sipermetrin memiliki efek *endocrine disruptor* dengan cara merusak sistem syaraf pusat di hipotalamus (Singh *et al.*, 2012). Komunikasi pada suatu sinaps terjadi karena lepasnya penghantar kimiawi yang ditimbun didalam vesikel akson prasinaptik. Penghantar saraf antara lain meliputi asetilkolin, katekolamin, serotonin, dan GABA (*Gamma Aminobutyric Acid*). Sipermetrin dapat mengganggu kinetic dan influx channel melalui inhibisi VGCC (*Voltage Gate Calcium Channel*). VGCC merupakan pengatur enzim jalur sinyal transduksi yaitu enzim proteinase dan fosfatase. Inositol trifosfat (IP₃)-mediated calcium influx diatur oleh reaksi fosforilasi dengan menggabungkan Ca²⁺ dependent serin (calcineurin) melalui reseptor IP₃ – peptidyl – prolyl – cis – trans isomerase FK – 506 binding protein BP 12. Sipermetrin merupakan inhibitor kuat terhadap calcineurin, sehingga mengganggu channel Ca²⁺ influx dan menurunkan kadar kalsium seluler sehingga menurunkan pengeluaran neurotransmitter (Wu *et al.*, 2005).



Apabila pengeluaran neurotransmitter lemah, maka hipotalamus tidak sensitif untuk mengeluarkan *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRh). Jika sekresi GnRh dihambat, maka terjadi penurunan produksi FSH secara signifikan. Penurunan FSH dapat menurunkan estradiol. Penurunan FSH dapat mempengaruhi folikulogenesis (Comack, 2001). FSH diperlukan untuk pematangan folikel sekunder menjadi folikel tersier, apabila FSH menurun, maka jumlah sel granulosa berkurang (Strauss dan Berbiery, 2013).

3. Sipermetrin dapat meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa folikel tersier dengan mengacaukan pengenalan reseptor estrogen.

Sipermetrin memiliki sifat *mimicry* dengan aksi estrogen, sehingga adanya sipermetrin yang masuk ke tubuh dapat mengacaukan pengenalan dengan reseptor estrogen. Metabolit sipermetrin yang meliputi *3-phenoxybenzyl alcohol*, *3-(4-hydroxy-3-phenoxy) benzyl alcohol*, and *3-phenoxybenzaldehyde* menunjukkan aktivitas estrogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen (McCarthy, 2006). Metabolit sipermetrin yang berikatan dengan reseptor estrogen dianggap hipotalamus sebagai umpan balik negatif dari ovarium, sehingga menstimulasi kelenjar hipofise anterior untuk menekan produksi FSH (McCarthy et al, 2006 dan Molavi et al, 2014). *Follicle Stimulating Hormone* diperlukan ovarium untuk proliferasi sel granulosa dan pertumbuhan folikel. Berkurangnya produksi FSH, maka menghambat pertumbuhan folikel dan menyebabkan apoptosis sel granulosa (Boron dan Boulpaep, 2012).



2.5 Hewan Coba

2.5.1 Jenis dan Karakteristik hewan coba

Klasifikasi tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebagai hewan percobaan tercantum pada tabel 2.4 sebagai berikut :

Tabel 2.4 Klasifikasi Hewan Percobaan

| Klasifikasi | Keterangan |
|-------------|-------------------|
| Kingdom | <i>Animal</i> |
| Filum | <i>Chordota</i> |
| Class | <i>Mammalia</i> |
| Ordo | <i>Rodentia</i> |
| Subordo | <i>Myomorpha</i> |
| Family | <i>Muridae</i> |
| Genus | <i>Rattus</i> |
| Species | <i>Norvegicus</i> |

Sumber : (Sowash, 2009)

Berdasarkan tabel 2.4, Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *Kingdom Animal*, *Fillum Chordota*, *Class Mammalia*, *Ordo Rodentia*, *Subordo Mymorpha*, *Family Muridae*, *Genus Rattus* dan *Spesies Norvegicus* (Sowash, 2009). Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tikus betina galur wistar. Berikut ini gambar hewan coba tikus betina galur wistar :



Gambar 2.11. *Rattus norvegicus* galur wistar (Estina, 2015)

Pada gambar 2.9 digambarkan jenis tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) telah banyak digunakan pada berbagai percobaan di laboratorium karena sistem kerjanya secara anatomi dan fisiologi menyerupai anatomi fisiologi manusia. Tikus galur



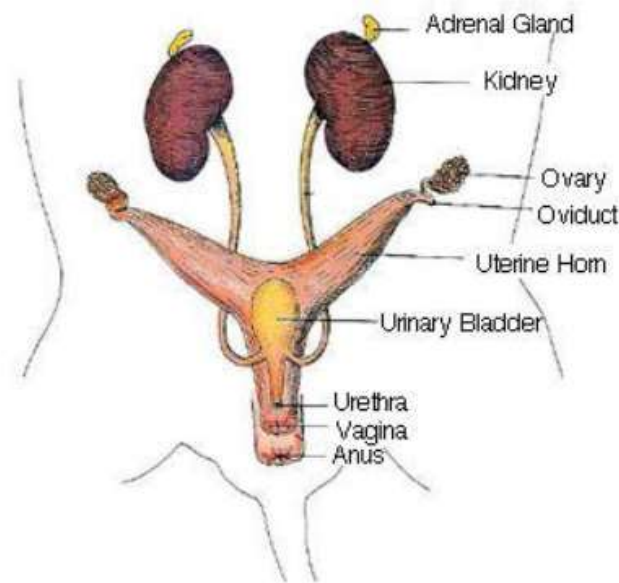
wistar menjadi salah satu strain tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium. Hal ini ditandai dengan kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor lebih pendek dari panjang tubuhnya.

Tikus wistar lebih aktif (agresif) daripada tikus jenis lain, seperti Sprague dawley. Tikus merupakan hewan coba utama dalam penelitian tentang sistem reproduksi manusia dan paparan toksikologi lingkungan (Koolhas, 2010). Keunggulan tikus putih adalah tidak mudah muntah, resisten terhadap infeksi, tidak memiliki empedu, dapat beradaptasi dengan iklim, dan aktivitasnya tidak mudah dipengaruhi oleh manusia di sekitarnya

(Kusumawati, 2004). Pada umur 2 bulan, berat badan tikus dapat mencapai 200 – 300 gram. Tikus tergolong hewan fotofobia tetapi mudah dipegang dibanding mencit (Kusumawati, 2004).

2.5.2 Anatomi dan Fisiologi Sistem Reproduksi Tikus

Anatomi sistem reproduksi tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar digambarkan pada gambar dibawah ini:



Gambar 2.12 Anatomi reproduksi *Rattus norvegicus* betina (Sowash, 2009)



Berdasarkan gambar 2.12, maka sistem reproduksi tikus betina memiliki 2 buah ovarium dan saluran genitalnya. Saluran Genital terdiri dari tuba, uterus, serviks dan vagina. Kematangan seksual tikus betina ditandai dengan membukanya vagina. Tikus mempunyai kemampuan resproduksi tinggi. Data fisiologi dan data reproduksi *Rattus norvegicus* betina dipaparkan pada tabel 2.5 dibawah ini.

Tabel 2.5 Data Fisiologi dan Reproduksi *Rattus norvegicus* Betina

| Data fisiologi : | Nilai |
|--------------------------|--------------------------------|
| Suhu Tubuh | 37,5 °C |
| Pernafasan | 75 – 115 kali/ menit |
| Denyut Jantung | 260 – 400 kali/menit |
| Tekanan darah : | |
| Sistolik | 84 – 184 mmHg |
| Diastolik | 58 – 145 mmHg |
| Kebutuhan Air Per hari | 8 – 11 ml/100 gr BB |
| Kebutuhan Makan per hari | 5 gram/100 gr BB |
| Berat Lahir | 5 gram |
| Kematangan Seksual | 7 minggu |
| Berat badan tikus dewasa | 250 – 300 gram |
| Data reproduksi : | |
| Usia siap kawin | 8 – 10 minggu |
| Lama Siklus estrus | 4 - 5 hari |
| Durasi estrus | 10 – 20 jam |
| Waktu ovulasi | 8 – 11 jam setelah awal estrus |
| Lama kebuntingan | 21 – 23 hari |
| Menopause | 15 – 18 hari |

(Kusumawati, 2004; Sengupta, 2013)

Berdasarkan tabel 2.5, vagina tikus betina membuka pada umur 34 – 109 hari. Kopulasi biasanya terjadi pada malam hari. Berat badan tikus siap kawin adalah 250 – 300 gram. Lama siklus estrus adalah 4-5 hari dengan durasi estrus 10-20 jam. Mekanisme ovulasi secara reflek dengan lama kebuntingan 21 – 23 hari (Kusumawati, 2004).



2.5.3 Pemeliharaan Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pemeliharaan tikus untuk penelitian dapat dilakukan pada kandang dengan bentuk seperti gambar di bawah ini :



Gambar 2.13 : Kandang pemeliharaan tikus (Branch, 2002)

Dalam melakukan penelitian, peneliti sebaiknya memelihara tikus didalam kandang. Berdasarkan gambar 2.13, maka kandang tikus dapat terbuat dari bahan *polycarbonate*, *polypropylene* atau *polystyrene plastic*.

Ukuran panjang dan lebar kandang sebaiknya lebih panjang dari ukuran tubuhnya, termasuk ekornya. Pengisian hewan tikus didalam kandang hendaknya tidak lebih dari 20 ekor tikus ukuran kecil agar tidak berdesakan. Suasana di dalam kandang diharapkan sesuai dengan lingkungan alam dan sesuai karakter binatangnya. Lokasi kandang hendaknya tidak mengganggu masyarakat sekitar agar limbahnya tidak menyebabkan polusi. Selain itu, perlu dipertimbangkan pula kenyamanan kehidupan hewan agar kandang terbebas dari kebisingan, polusi, air yang menggenang, dan banjir. Konstruksi bangunan harus memiliki ventilasi yang baik, sehingga suhu dan kelembabannya sesuai dengan kehidupan hewan (Kusumawati, 2004).



2.5.4 Siklus Estrus *Rattus norvegicus*

Siklus reproduksi pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) disebut juga dengan siklus estrus yang terdiri dari fase proestrus, estrus, meestrus, dan diestrus. Siklus estrus ini bisa diketahui dengan pemeriksaan apusan vagina. Lama siklus estrus adalah 4-5 hari. Fluktuasi hormonal dipengaruhi oleh sekresi gonadotropin pada pituitari anterior (Suckow *et al.* 2006).

Berikut ini fase-fase siklus estrus tikus betina (*Rattus norvegicus*) :

1. Proestrus

Pada fase proestrus berlangsung selama 12 jam. Pada pengamatan perilaku, tikus jantan tertarik pada tikus betina pada akhir fase proestrus. Pemeriksaan vagina menunjukkan adanya sel epitel nuklear.

Pada pemeriksaan ovarium, korpus lutein degenerasi, jaringan fibrosa mengalami proliferasi. Ukuran folikel lebih besar banyak mengandung *liquor folliculi*. Kadar *prolactin*, FSH, LH meningkat pada siang hari. Estradiol mencapai puncak (Jacoby *et al.* 2002).

2. Estrus

Pada fase estrus berlangsung 12 jam. Pada pengamatan perilaku, tikus jantan tertarik dan tikus betina pada postur lordosis. Pemeriksaan vagina menunjukkan 75% *nucleated cells* dan 25 % sel kerucut. Pada pemeriksaan ovarium menunjukkan korpus luteum sudah degenerasi dan tidak ada jaringan fibrosa. Pada fase estrus terjadi ovulasi yang diikuti dengan membesarnya ujung atas tuba falopii. Kadar Prolaktin, FSH dan LH sangat rendah (Suckow *et al.* 2006).

3. Metestrus

Pada fase metestrus berlangsung 21 jam. Pada pengamatan perilaku, tidak ada tikus jantan yang tertarik. Pemeriksaan vagina menunjukkan sel leukosit dengan nucleus dan sel kerucut. Pada pemeriksaan



ovarium menunjukkan korpus luteum berisi cairan dan folikel mulai mengalami atresia. Terjadi peningkatan kadar estradiol dan progesteron (Suckow *et al.* 2006).

4. Diestrus

Pada fase diestrus berlangsung 57 jam. Pada pengamatan perilaku tikus jantan tidak tertarik pada tikus betina. Pada pemeriksaan morfologi apusan vagina menunjukkan adanya sel leukosit. Pada ovarium, folikel mulai tumbuh menjelang akhir periode (Jacoby *et al.* 2002).

2.5.5 Perkembangan Folikel Pada Ovarium Tikus

Perkembangan folikel menurut Takagi *et al.* (2007) :

- a. Folikel primordial ditandai dengan satu lapisan skuamusa sel folikular.
- b. Folikel primer ditandai dengan satu lapisan kuboid sel folikular.
- c. Folikel sekunder ditandai dengan lebih dari satu lapisan sel folikular yang mengelilingi oosit.
- d. Folikel tersier ditandai dengan terbentuknya antrum, oosit sudah matur, terbentuk lebih dari 6 lapisan sel granulososa.

2.5.6 Apoptosis Sel Granulososa Mamalia

Pada Pemeriksaan secara histologi dan teknik ultrastruktural, sel granulososa yang mengalami degenerasi ditunjukkan dengan karakteristik kondensasi sitoplasma dan nucleus yang mengalami fragmentasi. Pemeriksaan dibawah mikroskop elektron, apoptosis ditandai dengan penyusutan sel, asimetri, *vacuolated mitochondria*, peningkatan fragmentasi inti sel, kondensasi kromatin dan diakhiri pembentukan badan apoptosis (Sharma dan Bhardwaj, 2009).



Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya

undergoes a dramatic transformation into a corpus luteum, which secretes large amounts of progesterone to maintain pregnancy if fertilization occurs (Figure 6.1). This complex process of folliculogenesis is strictly regulated by various signaling molecules in the body. For example, basic fibroblast growth factor, phosphate and tensin homolog (PTEN, a tumor suppressor gene), and anti-mullerian hormone (AMH) are critical to preserve the follicle pool at early stages. In contrast, correct responses to estradiol, FSH, and LH are essential for late stages of folliculogenesis (Barnett et al., 2006; Oktem and Urman, 2010; Son et al., 2011). Any disruptions during the process of folliculogenesis will eventually affect the development and function of the ovary and therefore, impact female reproductive health.

Throughout the reproductive life span of a female, only a very small portion of primordial follicles are selected to develop and ovulate. The vast majority (over 99%) are lost in various stages of development via a process called atresia (Hoyer and Sipes, 1996). Atresia is the process by which ovarian follicles undergo programmed cell death via apoptosis. This process is well controlled by various proliferation regulators and apoptotic factors (Matsuda-Minehata et al., 2006). Studies have shown that environmental toxicants, such as pesticides, can interrupt the expression and activities of factors that regulate atresia and therefore, induce atresia in the ovary (Miller et al., 2005; Basavarajappa et al., 2012). Because the vast majority of ovarian follicles are naturally lost via atresia, any pesticide that hastens this process could potentially cause premature ovarian failure.

Some pesticides can directly damage the ovary, but the specific effects and its implications for female reproductive health depend on the exposure time and the type of follicles targeted by the pesticide. Acute exposure to pesticides that selectively damage large growing or antral follicles only causes temporary disruption of cyclicity by reducing ovarian steroid production and ovulation. This is because the lost follicles can be replaced from the primordial follicle pool if the exposure is removed. Chronic exposure to pesticides, which damage large growing or antral follicles will cause permanent infertility because growing and antral follicles are required for fertility. Exposure to pesticides, which target primordial follicles can cause permanent infertility and premature ovarian failure (early menopause in

Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya



Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya

women) (Farr et al., 2006). This kind of damage is irreversible because once the primordial pool is destroyed, it cannot be replaced (Sobinoff et al., 2010).

Another possible ovarian target of pesticides is the OSE, which is composed of a single layer of epithelial cells that envelop the ovary. The OSE is a dynamic tissue that undergoes serial proliferation and apoptosis during ovulation. Recent experimental evidence indicates that the OSE is an obligate component of the ovulatory process (Murdoch and McDonnel, 2002). Pesticides that target the OSE might impact ovulation. Furthermore, unregulated proliferation and apoptosis in the OSE may lead to the most common ovarian cancer, epithelial ovarian cancer (Salehi et al., 2008). Animal studies have shown that MXC induces proliferation and oxidative DNA damage in the mouse OSE (Symonds et al., 2006, 2008). Epidemiology studies also suggest that herbicide exposure is positively associated with ovarian cancer (Young et al., 2005; Salehi et al., 2008). Thus, it is possible that chronic pesticide exposure may be one of the risk factors for ovarian cancer.

© 2010 Taylor & Francis Group, LLC

Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya

Finally, pesticides can impair proper ovarian function and cause fertility problems by disrupting the hormonal balance in the hypothalamic–pituitary–ovarian axis. One of the most important functional roles of the ovary is the production of the steroid hormones, estrogen and progesterone. Estrogens are essential for maintenance of reproduction and cyclicity, while progesterone is critical for maintenance of pregnancy (Christensen et al., 2012). In females, estrogen and progesterone production are strictly controlled by hormones secreted from the hypothalamus and the pituitary via feedback mechanisms (Figure 6.2). The hypothalamus produces and secretes gonadotropin releasing hormone (GnRH), which binds to receptors on the anterior pituitary and stimulates it to secrete FSH and LH. FSH and LH bind to their receptors on the ovary and regulate various critical processes for female reproduction, such as steroidogenesis, folliculogenesis, and ovulation. In turn, estrogen and progesterone feedback to the hypothalamus and the pituitary to regulate GnRH, FSH, and LH, respectively (Christensen et al., 2012). Pesticides with estrogenic activities mimic the ability of endogenous estrogen to negatively feedback to the hypothalamus and the pituitary and inhibit the production and secretion of GnRH, FSH, and LH and therefore, affect ovarian function.

Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya

**Daftar Pustaka****Primary Sources****Secondary Sources****Uncategorized References**

ATSDR 2003, *Toxicological Profile For Pyrethrins And Pyrethroids*, U.S Departement Of Health And Human Service, Atlanta. database.

Branch A.W., 2002. *Guidelines for the Housing of Rats in Scientific Institutions*, New South Wales, (<http://www.animaletics.org.au> diakses 14 Maret 2017).

Bretveld R.W., Thomas C.M., Schepeers P., Zielhuis G. dan Roeleveld N., 2006. Pesticide Exposure: The Hormonal Function Of The Female Reproduction System Disrupted?, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4.

Djojosumarto P., 2008. *Panduan Lengkap Pestisida dan Aplikasinya*, Agromedia 344.

EPA 2006, 'Reregistration Eligibility Decision for Cypermethrin ', dalam *EPA-HQ-OPP-2005-0293-0036* vol. EPA-HQ-OPP-2005-0293-0036 ed. EPA. Enviromental Protection Agency, United Stated, pp. 6-45.

Erickson G.F., 2008. 'Follicle Growth And Development', dalam, vol. 5, California.

Estina, 2015. *Jenis dan Ciri-ciri Tikus Laboratorium*, (<http://www/dokterternak.wordpress.com>, diakses 14 Maret 2017).

Evan R.C., Diplock A. dan Symons M. 1991, *Laboratory Technique In Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publisher, New York. database.

Hayes W., Thomas J. dan Gardner D. 2004, *Ovarian Toxicology*, CRC Press. database.

Hill M., 2017. *Embryology*, UNSW, New South Wales diakses March, 14).

Kementan 2015, 'Pengawasan Keamanan Pangan Terhadap Pemasukan dan Pengeluaran Pangan Segar Asal Tumbuhan', dalam *Permentan RI nomor 04/Permentan/PP.340/2/2015*, ed. Kementan. Kementan, Jakarta.

Kimia S.K., 2015. *Daftar Produk Insektisida*, Jakarta, (www.kresna.co.id, diakses March, 21st 2017).



Koolhas J. 2010, *The Laboratory Rat* 8edn, The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Netherland. database.

Kusumawati D., 2004. *Bersahabat dengan Hewan Caba*, Edisi 1, Gadjah Mada university Press, Yogyakarta.

Li H., Cheng F., Wei Y., Lidy M.J. dan You J., 2016. Global Occurence Of Pyrethroid Insecticides In Sediment And The Association Toxicological Effects On Benthic Invertebrates : An Overview, *Journal Of Hazardous Material*, 324(2017): pp. 258-271.

Lumongga F. 2008, *Apoptosis*, Universitas Sumatera Utara, Medan.

Manuaba I.B.G., 2007. *Pengantar Kuliah Obstetri*, EGC, Jakarta, 63-78.

Marieb E. 2003, 'Essential Of Anatomy and Physiology', dalam *Essential Of Anatomy And Physiology*. Pearson education.

Nursinah A. 2014, *Keamanan Pangan Produk Ikan Jambal Roti Manyung*. Desertasi Thesis. Tidak diterbitkan, Universitas Brawijaya.

Sakung J., 2004. Kadar residu Pestisida Golongan Organofosfat Pada Beberapa Jenis Sayuran *Jurnal Ilmiah Santina*, 1.

Sengupta P., 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's, *Int J Prev Med*, 4(6): pp. 624-630.

Sowash J., 2009. *Rat Dissection*, (<https://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf>), diakses.

Sudiana I.k. 2008, *Patobiologi Molekular Kanker*, Salemba Medika, Jakarta. database.

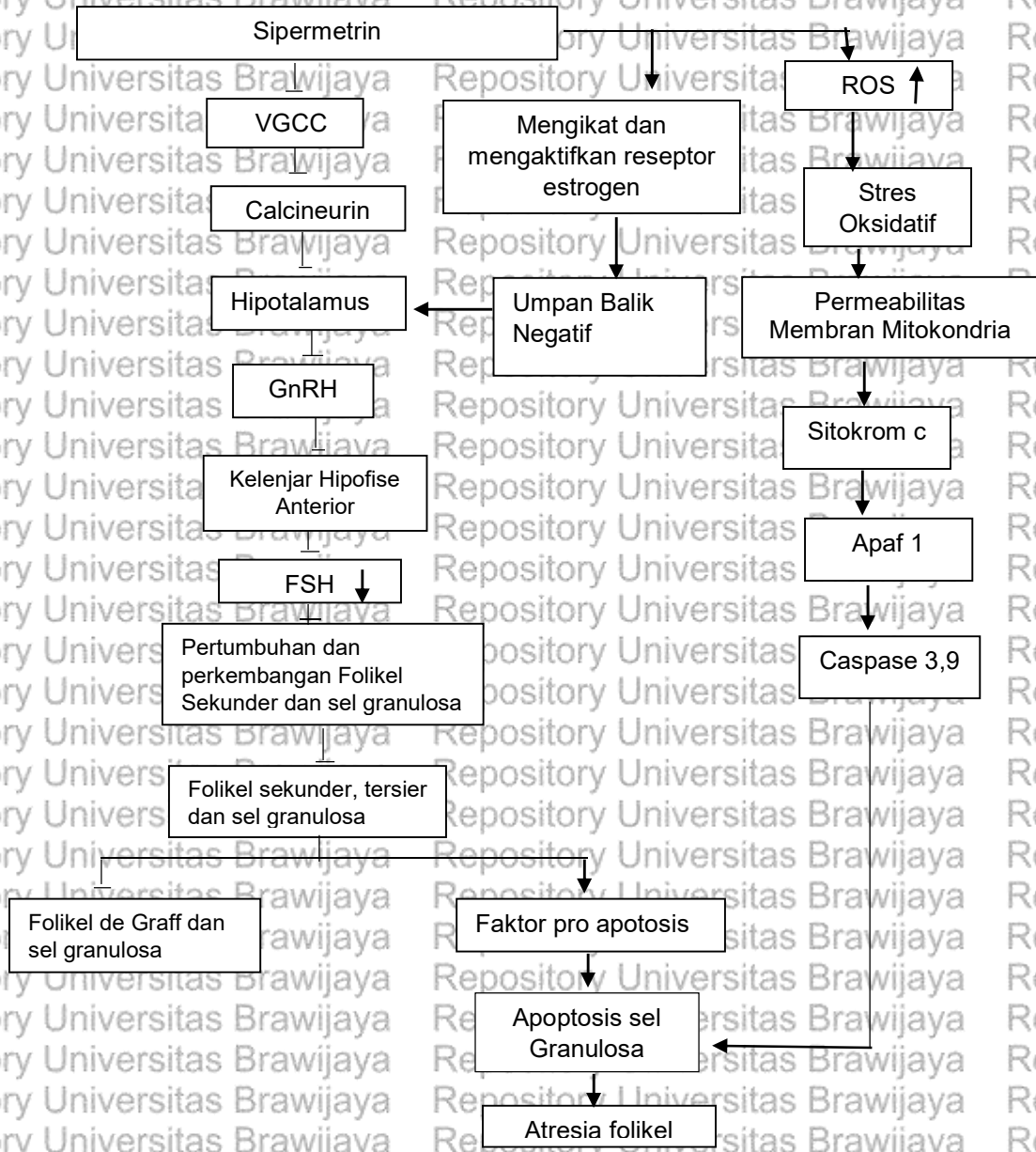
Winarsi H. 2011, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, 5 edn, Kanisius, Yogyakarta. database.



BAB 3

Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Hipotesis

3.1 Kerangka Teori

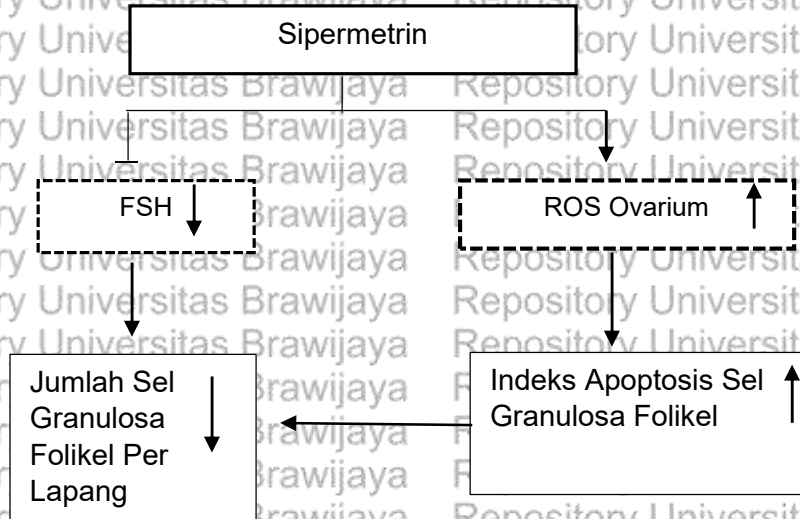


Gambar 3.1 Kerangka Teori

Keterangan :
 → : Memicu
 —| : Menghambat
 ↑ : Meningkatkan
 ↓ : Menurunkan



3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

Keterangan :

[Solid Box] = Diteliti

[Dashed Box] = Tidak diteliti

↑ = meningkat

↓ = menurun

→ = Memicu

← = Menghambat



Keterangan Kerangka Konsep :

Paparan sipermetrin secara oral akan diabsorpsi oleh saluran pencernaan dan didistribusikan kedalam sistem peredaran darah. Hal ini mengakibatkan hasil metabolisme sipermetrin yang berupa *cyanohydrines* terurai menjadi *cyano* dan *hidrines* sehingga memicu *superoxide anion* dan *hydrogen peroxide* dalam sel menginduksi produksi radikal bebas, peningkatan *lipid peroxidation* dan penurunan enzim antioksidan (SOD, CAT, GST, dan GPx), akibatnya terjadi penurunan antioksidan. Adanya ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas, dapat menyebabkan peningkatan ROS dalam ovarium. Adanya ROS yang melebihi kapasitas antioksidan dapat menimbulkan stress oksidatif di dalam ovarium. Stress oksidatif di ovarium dapat memicu peningkatan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel. Sipermetrin memiliki sifat *mimicry* dengan aksi estrogen, sehingga adanya sipermetrin yang masuk ke tubuh dapat mengacaukan pengenalan dengan reseptor estrogen. Metabolit sipermetrin yang merupakan *xenoestrogen* berikatan dengan reseptor estrogen dianggap hipotalamus sebagai umpan balik negatif dari ovarium, sehingga menstimulasi kelenjar hipofise anterior untuk menekan produksi FSH. Dengan turunnya FSH dan tingginya ROS, maka dapat terjadi penurunan jumlah sel granulosa dan peningkatan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel.

3.3 Hipotesis

Paparan sipermetrin dosis rendah per oral dapat menurunkan jumlah sel granulosa dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel tikus betina galur wistar.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *true experimental* dengan memakai pendekatan *post test only with control group design* (Budiarjo, 2004). Penelitian *true experimental* adalah penelitian yang memberikan manipulasi terhadap variabel independent, melakukan randomisasi untuk memisahkan sampel penelitian serta ada dua atau lebih kelompok sampel (*Treatment and control groups*). Tahapan pada penelitian ini yaitu memberikan perlakuan pada 3 kelompok dengan pemberian dosis berbeda sebagai kelompok perlakuan dan 1 kelompok sebagai kontrol pada hewan coba tikus betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Penelitian ini dilakukan selama 28 hari dengan memberikan paparan sipernetrin secara oral melalui sonde.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di 3 laboratorium, yaitu laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan hewan coba. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeriksaan indeks apoptosis sel granulosa. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pembuatan preparat histologi ovarium dan pemeriksaan jumlah sel granulosa per lapang pandang. Waktu penelitian ini direncanakan terlaksana mulai bulan juni sampai juli 2017.



4.3 Sampel Penelitian

4.3.1 Kriteria Sampel

Tikus yang digunakan berusia 10 – 12 minggu (usia reproduktif) dengan berat badan 100 – 150 gram dengan kriteria inklusi sehat, tidak bunting dan tidak mengalami kecacatan. Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah hewan dalam mati saat perlakuan. Sampel diperoleh dari Universitas Islam Negeri Syarif Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.3.2 Besar Sampel

Besar sampel diperoleh berdasarkan rumus replikasi (Hanafiah, 2014), yaitu :

$$\begin{aligned} ((4-1) (r-1)) &\geq 15 && \text{Keterangan} \\ ((4-1) (r-1)) &\geq 15 && t = \text{jumlah perlakuan} \\ 3 (r-1) &\geq 15 && r = \text{jumlah replikasi} \\ 3r - 3 &\geq 15 \\ 3r &\geq 18 \\ r &\geq 6 \end{aligned}$$

Besar sampel didapatkan dengan mengkalikan jumlah replikasi dengan jumlah kelompok. Dengan demikian, besar sampel didapatkan 24 ekor tikus. Untuk menghindari sampel mati akibat toksisitas, sampel dilebihkan jumlahnya 2 ekor. Sehingga didapatkan hasil masing – masing kelompok sebesar 8 ekor tikus. Jadi, jumlah keseluruhan sampel menjadi 32 ekor.



4.3.3. Pembagian Kelompok

Besar sampel sejumlah 24 ekor tikus akan dibagi menjadi 4 kelompok antara lain :

K1 : Kelompok kontrol, yaitu kelompok tikus tanpa perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus betina galur wistar. Pada kelompok tikus ini tidak diberikan sipermetrin, tetapi hanya diberikan aquabidest.

K2 : Kelompok perlakuan 1 terdiri dari 6 ekor tikus betina galur wistar. Pada kelompok ini tikus diberikan larutan sipermetrin dalam aquabidest dengan dosis 10 mg/kgBB.

K3 : Kelompok perlakuan 2 terdiri dari 6 ekor tikus betina galur wistar. Pada kelompok ini tikus diberikan sipermetrin dalam aquabidest dengan dosis 15 mg/KgBB.

K4 : Kelompok perlakuan 3 terdiri dari 6 ekor tikus betina galur wistar. Pada kelompok ini diberikan larutan sipermetrin dalam aquabidest dengan dosis 20 mg/kgBB.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yaitu pada dosis 20 mg/kgBB sudah ada efek terhadap morfologi ovarium tikus (Grewal *et al*, 2010).

4.4 Variabel penelitian

4.4.1 Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah sipermetrin dosis rendah secara oral.

4.4.2 Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah sel granulosa per lapang pandang dan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel.



4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional Penelitian

| No | Variabel | Definisi Operasional | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala Data |
|----|---|---|--------------------|--|------------|
| 1 | Sipermetrin Per oral | Insektisida yang bermerk dagang rhizotin 100 EC dengan kandungan bahan aktif sipermetrin 100 mg/ml diberikan dengan dosis 10, 15, 20 mg/kgBB selama 28 hari | Sput | Mendapat dosis sipermetrin yang sesuai: 10, 15, 20 mg/kgBB | Ratio |
| 2 | Jumlah sel granulosa per lapang pandang | Jumlah sel berbentuk kuboid yang terletak di sekeliling folikel yang mempunyai ciri : Folikel primer: memiliki 1-2 lapisan sel granulosa, zona pelusida sedikit, tidak ada antrum. Folikel sekunder: memiliki 2-6 lapisan sel granulosa, antrum kecil, zona pelusida sedikit. Folikel tersier: memiliki lebih dari 6 lapisan sel granulosa, antrum besar, cairan folikel banyak dan oosit matur (oosit bersih, granular sitoplasma sedang, dan warna zona pelusida yang jelas). Pengamatan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. | Hemato xylen Eosin | Rata-rata jumlah sel granulosa per lapang pandang yang diamati dari pembesaran 400 kali sebanyak 10 lapang pandang | Ratio |
| 2 | Indeks Apoptosis Sel Granulosa | Persentase sel granulosa pada folikel primer, sekunder dan tersier yang mengalami apoptosis dalam 1000 sel granulosa yang apoptosis mempunyai ciri inti sel mengkerut, terdapat fragmentasi DNA dan inti sel berwarna coklat tua. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. | TUNEL Assay | $\frac{\sum \text{sel granulosa apoptosis}}{1000 \text{ sel Granulosa}} \times 100\%$ | Ratio |



4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan bahan – bahan sebagai berikut :

1. Bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah sipernetin dengan merk Rizotin100

EC produksi CV Uni Agro Chemika.

2. Bahan pemeliharaan hewan coba

Pemeliharaan hewan coba diperlukan bahan sebagai berikut :

Sekam sebagai alas kandang, pakan standar produk PT Comfeed

Indonesia, dan air minum untuk hewan coba dari air keran secara *ad libitum* yang diberikan tiap hari.

3. Bahan pemeriksaan serum dan pembuatan sediaan PA

a. Pemrosesan jaringan : membutuhkan formalin 10 % sebanyak 1 L.

b. Pembuatan preparat histologi dan *Haematoxylin eosin*

1) Natrium klorida

2) Xylo

3) Parafin

4) Etanol

5) Entelan

6) Cat utama Harris Hematoxilen

7) Cat eosin 1 %

4. Pemeriksaan apoptosis dengan TUNEL Assay

Bahan yang digunakan antara lain :

1) Xilol

2) Etanol absolut

3) Etanol 90 %

4) Etanol 80 %



- 5) Etanol 70 %
- 6) Aquabides steril
- 7) Larutan TBS
- 8) Proteinase K (Roche; CAT 03115 844 001)
- 9) TdT
- 10) *Equilibration buffer*
- 11) *TdT labelling reaction*
- 12) Tdt Enzym
- 13) *Stop buffer*
- 14) *Blocking buffer*
- 15) Conjugate
- 16) DAB *solution* (Roche; CAT 11718 096 001)
- 17) Mayer's Haematoxilen (Scytek; CAT HMM 125)
- 18) Entellen
- 19) *Cover glass*
- 20) Tisu

4.6.2 Alat Penelitian

- 1) Kandang tikus ukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm sebanyak 8 buah dengan alas diberi sekam dan bagian atas kandang ditutupi dengan kawat berjaring. Setiap kandang akan diisi 3 ekor tikus.
- 2) Tempat makanan dan minuman tikus.
- 3) Timbangan elektrik.
- 4) Spuit 3 cc dengan ujungnya dipasang sonde.
- 5) Untuk pengambilan organ tikus menggunakan :
Alat bedah minor (scalpel, pinset, gunting, klem, pemegang jaringan), tabung berisi formalin 10 %, papan untuk meja



pembedahan, wadah untuk tempat penyimpanan sementara organ sebelum dibuat preparat histologi.

6) Pemeriksaan indeks apoptosis

Alat yang dibutuhkan adalah slide, mikropipet, camber dan mikroskop cahaya, software Fiji.

7) Pemeriksaan jumlah sel granulosa per lapang pandang

Alat yang dibutuhkan adalah slide, mikroskop cahaya dan software Fiji.

4.7 Prosedur penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Aklimatisasi Hewan Coba

Tikus betina galur wistar dibiarkan 1 minggu didalam kandang untuk beradaptasi dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stres.

Selama aklimatisasi diberikan pakan standard dan minum aquabides.

Setelah diaklimatisasi, tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

4.7.2 Pemeliharaan Hewan Coba

Perawatan tikus selama perlakuan sama saat aklimatisasi. Tikus dimasukkan kedalam kandang yang terbuat dari baskom plastik

berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan diberi tutup kawat yang kuat. Dan dasar kandang dialasi sekam setebal 0,5 – 1 cm dan diganti

setiap 3 hari sekali. Setiap kandang berisi 3 ekor tikus. Cahaya ruangan dibuat 12 jam terang dan 12 jam gelap. Temperatur serta

kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran suhu ruangan yaitu 27 – 28 °C. Tikus diberikan pakan standar yang berbentuk palet

merk comfeed dan minunya diberi air matang secara *ad libitum*. Pemberian makan diberikan 1 kali sehari dan pada sore hari sebanyak

40 gr/hari/ekor.



4.7.3 Penimbangan Hewan Coba

Penimbangan berat badan tikus dilakukan tiap minggu menggunakan timbangan elektrik dan wadah plastik. Cara penimbangan yaitu dengan meletakkan timbangan di tempat datar kemudian timbangan dikalibrasi dengan meletakkan timbangan diatas timbangan. Setelah itu, tikus dimasukkan ke wadah plastik dan dilakukan pencatatan.

4.7.4 Pemberian Sipermetrin

Penelitian ini menggunakan insektisida sipermetrin dengan merk dagang Rizotin 100 EC berbentuk cairan. Sipermetrin diberikan secara oral melalui sonde 1 kali sehari pada siang hari.

4.7.5 Pembuatan Larutan Sipermetrin dan Penentuan Dosis

Mengawali pembuatan larutan sipermetrin sesuai dosis yang ditentukan yaitu 10, 15 dan 20 mg/kgBB. Peneliti menyiapkan stok larutan yang sudah tersedia dari pabrik yaitu 100 mg/ml. Kemudian larutan tersebut diencerkan dengan larutan stok dengan rumus :

$$C1.V1 = C2.V2$$

Keterangan :

C1 = Konsentrasi larutan stok (mg)

C2 = Konsentrasi larutan uji yang digunakan (mg)

V1 = Volume larutan stok (ml)

V2 = Volume larutan yang ingin dibuat (ml)

Larutan stok dibuat setiap hari sebanyak 1 ml agar larutan sipermetrin tidak mengendap karena sipermetrin merupakan larutan emulsi yang bersifat lipofilik.



Pembuatan larutan sipermetrin 10, 15, dan 20 mg/kgBB sebagai berikut :

1) Sipermetrin dosis 1 (10 mg/kgBB)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ mg} \cdot V_1 = 10 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{10 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ ml}$$

Jika berat tikus 120 gram, maka dibutuhkan 0,012 ml larutan stok sipermetrin untuk membuat dosis 20 mg/kgBB kemudian ditambahkan aquabidest ad 1 ml.

2) Sipermetrin dosis 2 (15 mg/kgBB)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ mg} \cdot V_1 = 15 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{15 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ ml}$$

Jika berat tikus hanya 120 gram, maka dibutuhkan 0,018 ml larutan stok sipermetrin untuk membuat dosis 15 mg/kgBB kemudian ditambahkan aquabidest ad 1 ml.

3) Sipermetrin dosis 3 (20 mg/kgBB)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \text{ mg} \cdot V_1 = 20 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{20 \text{ mg} \cdot 1 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V_1 = 0,20 \text{ ml}$$



Jika berat tikus hanya 120 gram, maka dibutuhkan 0,024 ml larutan stok sipermetrin untuk membuat dosis 20 mg/kgBB kemudian ditambahkan aquabidest ad 1 ml.

4.7.6 Penentuan Siklus Estrus

Penentuan siklus estrus ini menggunakan swab vagina pada hari ke-28 setelah paparan. Swab vagina dilakukan oleh tenaga terlatih dari Fakultas kedokteran hewan Universitas Brawijaya. Langkah pengambilan swab vagina tikus diantaranya :

1. Menyiapkan *cotton buds*, *cover glass*, cat giemsa dan mikroskop.
2. Memasukkan *cotton buds* ke lubang vagina untuk mendapatkan lender lalu meletakkan lendir tersebut ke *objek glass* dan diberi cat *metilen blue* lalu ditutup dengan *cover glass*.
3. Melakukan pemeriksaan ulas vagina dibawah mikroskop untuk menentukan fase proestrus.

Pemeriksaan dilakukan pada fase proestrus karena pada fase ini kadar FSH tinggi, sehingga meningkatkan kadar estrogen. Hal ini dapat mempengaruhi perkembangan folikel ovarium.

4.7.7 Pelaksanaan Penelitian

Hewan coba terdiri atas 4 kelompok. 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Masing – masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus. Kelompok perlakuan diberi paparan sipermetrin per oral melalui sonde dengan dosis 10, 15, dan 20 mg/kgBB. Pemberian sipermetrin dilakukan 1 kali sehari pada siang hari setelah aklimatisasi.

4.7.8 Pembedahan Hewan Coba

Pembedahan hewan coba dilakukan pada hari ke – 28 pemberian paparan sipermetrin dan telah dinyatakan fase proestrus.



Penatalaksanaan pembedahan adalah sebagai berikut :

- 1) Menyiapkan peralatan bedah minor : ketamine injeksi, etanol 70 % , gunting, pinset, dan botol tutup berisi formalin 10 % untuk tempat organ dan blanko untuk pencatatan.
- 2) Melakukan anestesi dengan cara menginjeksi ketamine 1 % pada paha tikus.
- 3) Memastikan tikus tidak merasa nyeri dengan menggunakan pinset cirurgi.
- 4) Tikus yang sudah tidak bergerak diletakkan diatas alas papan dengan posisi perut menghadap atas lalu difiksasi dengan jarum injeksi yang diletakkan di keempat kaki tikus.
- 5) Melakukan insisi pada daerah thorax.
- 6) Dinding perut dibuka dengan pinset dan gunting lalu membuka rongga peritoneum dengan hati – hati dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan samping kiri dan kanan lalu sisi atas dan bawah kemudian membuka diafragma. Kulit yang menutupi bagian dadalu dibuka dengan insisi dari *prosesus xifoideus* kearah leher dan ditarik ke samping.
- 7) Ovarium kiri dan kanan diambil dan jaringan yang mengikatnya dipotong.
- 8) Ovarium dibersihkan dari ligamen yang melekat lalu darah dibersihkan dengan larutan NaCL 0,9 % dan ditiriskan pada kertas saring.
- 9) Setelah organ mengering, ovarium ditimbang dengan timbangan analitik.
- 10) Organ selanjutnya dimasukkan ke wadah plastik berisi larutan *fixative buffer formalin* 10 % dan direndam selama 12 – 24 jam.



11) Ovarium akan digunakan untuk TUNEL assay dan Heamatoxylin eosin.

12) Setelah proses pengambilan organ, tikus dikubur dengan kedalaman tanah 1 meter untuk menghindari bau yang menyengat dan pencemaran lingkungan.

4.7.9 Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

1. *Trimming*

Prosedur trimming ini dilakukan dengan cara mencuci bersih spesimen ovarium menggunakan larutan air mengalir untuk

menghilangkan larutan fiksasi, yang sebelumnya spesimen difiksasi dahulu dengan larutan fiksatif formalin 10 % dengan perbandingan

volume specimen dan larutan fiksatif formalin adalah 1: 10 untuk mendapatkan hasil yang baik. Jaringan spesimen kemudian

dipotong setebal 2 – 4 mm menggunakan pisau scalpel nomor 22 –

24. Potongan jaringan tersebut dimasukkan kedalam *embedding*

cassete, tiap *embedding cassete* berisi 1 – 5 buah potongan

jaringan yang disesuaikan dengan besar kecilnya potongan.

Kemudian dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit.

2. Dehidrasi

Keranjang yang didalamnya berisi jaringan ovarium dimasukkan

kedalam alat *processor otomatis* dengan tujuan menarik air dari

jaringan ovarium secara bertahap dengan menggunakan alat

processor otomatis tersebut.



Jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan cara dipindah dari alkohol dengan berbagai konsentrasi yang ditunjukkan pada tabel 4.2, yaitu :

Tabel 4.2 Konsentrasi alkohol

| Nama Zat Kimia | Waktu |
|-----------------|-------|
| Alkohol 70 % | 2 jam |
| Alkohol 80 % | 2 jam |
| Alkohol 90 % | 2 jam |
| Alkohol 96 % | 2 jam |
| Alkohol Absolut | 2 jam |

3. *Clearing* (Penjernihan)

Proses ini bertujuan agar jaringan menjadi transparan serta menggantikan cairan alkohol dengan larutan xylol sebanyak 2 kali. Masing-masing 2 jam.

4. *Impregnasi*

Proses ini bertujuan menyamakan keadaan jaringan dengan bahan pengeblokan (embedding). Proses ini menggunakan paraffin cair dengan temperature 56-60° C berlangsung selama 2 jam.

5. *Embeding*

Setelah proses dehidrasi, Jaringan diblok dengan paraffin agar memudahkan dalam penyayatan.

6. Penyayatan Jaringan Yang Sudah Diparaffin Blok

Jaringan yang sudah diparaffin blok lalu dipotong dengan mikrotom dengan arah membujur setebal 4 μ m. Hasil sayatan kemudian dimasukkan kedalam *water bath* dengan suhu 40° C. Hasil sayatan yang terbaik yang dipilih lalu direkatkan pada obyek glas dengan bantuan kuas. Obyek glas sebelumnya telah diolesi *poly-lisin*.



Obyek glas yang telah ditemplei hasil sayatan jaringan tadi lalu dipanaskan pada *hot plate* bersuhu 60° C selama 45 menit.

4.7.10 Prosedur Pewarnaan Haematoxylen Eosin

Setelah pembuatan slide yang berisi jaringan ovarium untuk pewarnaan HE, maka langkah selanjutnya antara lain :

1. Deparafinisasi

Secara berturut-turut slide dicuci menggunakan xylol sebanyak 3 kali selama 5 menit dan dilakukan dalam suhu ruangan.

2. Hidrasi

Slide dicuci menggunakan alcohol secara berturut-turut alcohol 100 % selama 4 menit, alcohol 96 % selama 3 menit, alcohol 90 % selama 3 menit, alcohol 80 % selama 2 menit dan alcohol 70 % selama 2 menit. Selanjutnya cuci dengan air mengalir selama 10 menit.

3. Pewarnaan HE (Haematoxylen Eosin)

Slide diberikan cat utama hematoxylin selama 5 menit. Kemudian cuci dengan air mengalir selama 15 menit. Kemudian celupkan dalam alcohol 1 % sebanyak 205 kali. Selanjutnya pencelupan kedalam amonia cair sebanyak 3-5 kali. Lalu diberi cat pembanding eosin 1 % selama 5 menit.

4. Dehidrasi

Slide dilakukan dehidrasi dengan menggunakan alcohol secara berturut-turut : Alcohol 70 % selama 2 menit, alcohol 80 % selama 2 menit, alcohol 90 % selama 4 menit, alcohol 96 % selama 4 menit dan alcohol absolut selama 5 menit.



5. *Clearing*

Slide dimasukkan ke dalam xylol 3 kali masing-masing selama 5 menit.

6. *Mounting*

Slide ditetesi entelan dan ditutup dengan cover glass serta dibiarkan kering dalam suhu ruangan.

4.7.11 Analisis Jumlah Sel Granulosa

Menghitung jumlah sel granulosa pada slide HE folikel primer, sekunder dan tersier ovarium yang telah discan pada mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali yang dilengkapi dengan aplikasi Olyvia Olympus. Perhitungan jumlah sel granulosa per lapang pandang dilakukan dengan melihat dan menghitung sel yang berbentuk kuboid di sekeliling folikel yang mempunyai ciri

Folikel primer: memiliki 1-2 lapisan sel granulosa, zona pelusida sedikit, tidak ada antrum.

Folikel sekunder: memiliki 2-6 lapisan sel granulosa, antrum kecil, zona pelusida sedikit.

Folikel tersier: memiliki lebih dari 6 lapisan sel granulosa, antrum besar, cairan folikel banyak dan oosit matur (oosit bersih, granular sitoplasma sedang, dan warna zona pelusida yang jelas) serta dikelilingi kumulus oophorus. Penghitungan sel dilakukan dengan bantuan software Fiji.

4.7.12 Prosedur *Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick end Labeling (TUNEL) Assay* untuk apoptosis

Apoptosis diperiksa melalui in situ apoptosis detection kit merk Roche (*In situ cell death Detection kit*, POD CAT No. 11684817910).



Langkah pemeriksaan TUNEL adalah sebagai berikut :

1) Deparafinasi

Melakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylo/ sebanyak 2 kali masing – masing 10 menit.

2) Rehidrasi

Mencelupkan slide preparat dengan menggunakan etanol 100 % selama dua menit kemudian dicelupkan ke larutan etanol 95 % selama dua menit, kemudian dipindah ke etanol 70 % selama satu menit kemudian rehidrasi slide preparat dengan aquabidest steril selama dua menit.

3) Permeabilitas spesimen

a. Mengencerkan proteinase K menggunakan air dengan perbandingan 1 : 100.

b. Teteskan proteinase K solution pada tris HCL ph 7,4 kemudian inkubasi selama 25 menit dengan suhu 37° C

c. Cuci slide dengan PBS 3 x selama 5 menit.

d. Keringkan sekeliling slide dengan hati – hati.

4) *Reaction Labelling*

a. Siapkan *TUNEL Reaction Mixture*.

b. Teteskan TdT *equilibration buffer* pada specimen dengan hati-hati dengan tidak menyentuh specimen.

c. Teteskan dengan segera 40 µLTdt *TUNEL Reaction Mix* diatas specimen dan beri coverslip diatasnya untuk mengurangi penguapan selama inkubasi.

d. Tempatkan slide pada chamber dan inkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 1 jam dan kurangi cahaya di laboratorium

e. Cuci PBS 3 x 5 menit



5) Deteksi

- a. Mengencerkan Converter POD dari freezer sampai saat digunakan
- b. Teteskan converter POD di atas specimen dengan hati-hati
- d. Cuci slide dengan PBS 3 x selama 5 menit.

6) Development

- a. Keringkan sekeliling slide dengan hati-hati.
- b. Siapkan DAB solution dengan menambahkan 4 μL DAB solution ke dalam 116 μL DAB solution
- c. Teteskan 100 μL DAB solution yang telah disiapkan diatas specimen, inkubasi selama 15 menit.
- d. Cuci dengan aquadest.

7) Counterstain and storage

- a. Teteskan segera 100 μL Mayer's haematoxylen, inkubasi pada suhu ruang selama 1-3 menit.
- b. Tekan tepi slide berlawanan dengan tissue pengering untuk menyerap pewarnaan paling banyak, tempatkan slide pada Coplin Jar.
- c. Mounting coverslip di atas slide.

4.7.13 Analisis indeks apoptosis sel granulosa folikel

Menghitung jumlah sel granulosa yang mengalami apoptosis pada folikel primer, sekunder dan tersier ovarium yang telah difoto menggunakan mikroskop cahaya merk Olympus tipe MFD 5X51 dengan pembesaran 1000 kali. Perhitungan jumlah sel granulosa yang apoptosis pada folikel primer, sekunder dan tersier dilakukan dengan melihat dan menghitung sel yang ciri-cirinya inti sel granulosa berwarna coklat, bentuk sel granulosa



shrinkage/mengecil dan dihitung pada 1000 sel granulosa.

Penghitungan sel apoptosis pada 1000 sel granulosa dilakukan dengan bantuan software Fiji.

4.8 Teknik Analisa data

Pada penelitian ini teknik analisa dilakukan dengan bantuan SPSS for windows.

4.8.1 Uji Normalitas Data

Sebelum uji statistik, terlebih dahulu menggunakan uji normalitas data apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah < 50 sampel, maka uji normalitas yang digunakan adalah *saphiro wilk*.

4.8.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui sampel yang diteliti apakah memiliki varians yang sama. Jika Sig atau *p value* menunjukkan nilai lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, maka data tersebut homogen. Jika sampel tidak mempunyai varians yang homogen, maka Uji Anova harus diikuti dengan uji Tamhane (Swarjana, 2012).

4.8.3 Uji Korelasi

Uji korelasi merupakan analisis untuk mengetahui keeratan hubungan dua variabel. Keeratan tersebut dibagi menjadi 3 hubungan, yaitu hubungan positif, hubungan negatif dan tidak ada hubungan. Dalam uji korelasi tidak melihat variabel mana yang lebih berpengaruh terhadap hubungan variabel lainnya. Analisis korelasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pearson* karena memiliki variabel independen numerik dan variabel dependen numerik (Dahlan, 2011).



4.8.4 Analisis Regresi

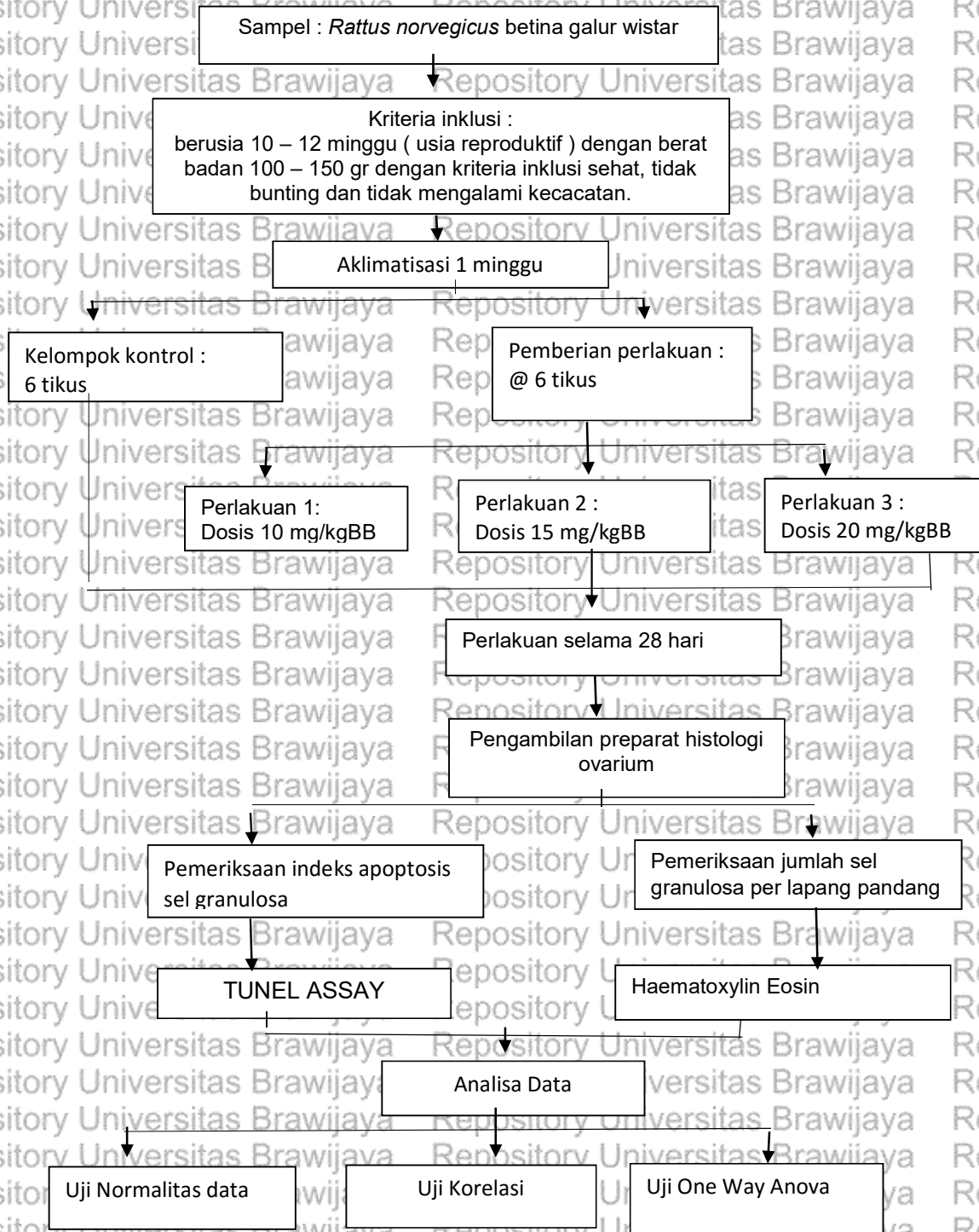
Analisis regresi merupakan analisis yang digunakan untuk menguji fungsional hubungan antara dua variabel atau lebih. Analisis regresi ada 2 berdasarkan jumlah variabel independen (x), yaitu analisis regresi sederhana dan analisis regresi berganda. Analisis regresi sederhana digunakan apabila variabel independen (x) hanya 1 berhubungan dengan variabel dependen (y), sedangkan analisis regresi berganda digunakan apabila variabel independen (x) lebih dari 1 berhubungan dengan variabel dependen (y) (Dahlan, 2011).

4.8.5 Uji *One Way Anova*

Uji one way anova adalah uji yang digunakan untuk membandingkan rerata variable terukur antara kelompok kontrol dan perlakuan (Dahlan, 2011). Tujuan uji statistik ini adalah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian larutan sipermetrin per oral pada tikus betina galur wistar. Jika pada uji *one way Anova* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak, maka ada perbedaan bermakna. Maka dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu uji beda nyata terkecil / BNT. Uji beda nyata ini bertujuan untuk menentukan berapa dosis sipermetrin yang paling berpengaruh terhadap jumlah sel granulosa per lapang pandang dan indeks apoptosis sel granulosa.



4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium fisiologi menggunakan hewan coba berupa tikus putih betina galur wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Berikut ini hasil penelitian dan analisis data pada penelitian pengaruh paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap jumlah sel granulosa dan indeks apoptosis pada folikel tikus betina galur wistar.

5.1. Gambaran Umum Hasil Penelitian

Berikut deskripsi Berat badan tikus selama proses penelitian:

Tabel 5.1. Gambaran Berat Badan Tikus Selama Proses Penelitian

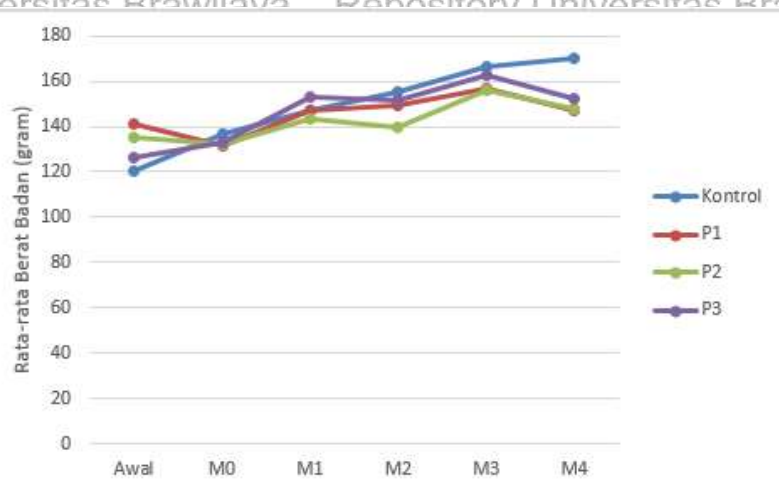
| Kelompok | Berat Badan (gram) | | | | | |
|----------|--------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|------------------|
| | Awal | Minggu 0 | Minggu 1 | Minggu 2 | Minggu 3 | Minggu 4 |
| Kontrol | 120.25 ± 3.68 a | 136.7 ± 30.25 | 146.93 ± 22.43 | 155.19 ± 17.32 | 166.09 ± 13.19 | 170.17 ± 12.42 b |
| P1 | 141.05 ± 9.38 b | 131.64 ± 5.55 | 146.86 ± 14.3 | 149.39 ± 14.24 | 156.93 ± 18.29 | 147.35 ± 13.88 a |
| P2 | 135.1 ± 6.01 b | 132.13 ± 5.46 | 143.63 ± 8.27 | 139.78 ± 7.57 | 156.09 ± 5.26 | 147.55 ± 4.01 a |
| P3 | 126.49 ± 5.54 a | 132.92 ± 15.6 | 152.82 ± 18.97 | 151.74 ± 25.03 | 162.93 ± 20.34 | 152.41 ± 15.68 a |
| p-value | 0.000 | 0.957 | 0.818 | 0.467 | 0.633 | 0.013 |

Berdasarkan pada tabel 5.1 di atas, ditunjukkan bahwa pada awal penelitian, terdapat perbedaan berat badan tikus dimana kelompok P1 dan P2 memiliki berat badan relatif lebih tinggi daripada kelompok kontrol dan P3 ($p < 0.05$).

Seiring dengan berjalannya penelitian, dari minggu ke-0 hingga minggu ke-3 rata-rata berat badan tikus pada semua kelompok relatif sama atau tidak berbeda signifikan ($p > 0.05$). kemudian, pada minggu ke-4, rata-rata berat badan tikus berbeda signifikan dimana kelompok kontrol memiliki rata-rata berat badan yang lebih tinggi daripada kelompok perlakuan.



Berikut grafik pertumbuhan tikus selama proses penelitian:



Gambar 5.1. Grafik Pertumbuhan Berat Badan Tikus Selama Penelitian

Berdasarkan pada gambar 5.1, ditunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, rata-rata berat badan tikus selama proses penelitian cenderung mengalami peningkatan. Sedangkan pada kelompok perlakuan, baik P1, P2, maupun P3 memiliki tren yang lebih fluktuatif. Artinya, kelompok tikus yang diberikan paparan sipermetrin mengalami gangguan pertumbuhan, terutama dari minggu ke-3 menuju ke minggu ke-4, semua kelompok perlakuan mengalami penurunan berat badan.

5.2 Pengujian Asumsi yang Melandasi ANOVA

Proses pengujian hipotesis dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA, terlebih dahulu dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$ (Dahlan, 2011).



Dengan menggunakan bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.2. Uji Asumsi Normalitas

| Variabel | Koefisien | p-value | Keterangan |
|---|-----------|---------|------------|
| Jumlah Sel Granulosa Folikel primer | 18.01 | 0,116 | Normal |
| Jumlah Sel Granulosa Folikel sekunder | 19.8 | 0,563 | Normal |
| Jumlah Sel Granulosa Folikel tersier | 26.3 | 0,165 | Normal |
| Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel primer | 17.3 | 0,212 | Normal |
| Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel sekunder | 26.2 | 0,368 | Normal |
| Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel tersier | 32.5 | 0,285 | Normal |

Berdasarkan pada tabel 5.2 di atas, pada variabel jumlah sel granulosa pada folikel primer, sekunder dan tersier didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada variabel tersebut telah terpenuhi. Demikian juga pada variabel indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier, didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi normalitas telah terpenuhi.

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$.



Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam :

Tabel 5.3. Uji Asumsi Homogenitas Ragam

| Variabel | p-value | Keterangan |
|---|---------|---------------|
| Jumlah sel granulosa folikel primer | 0.083 | Homogen |
| Jumlah sel granulosa folikel sekunder | 0.104 | Homogen |
| Jumlah sel granulosa folikel tersier | 0.001 | Tidak Homogen |
| Indeks apoptosis sel granulosa folikel primer | 0.834 | Homogen |
| Indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder | 0.108 | Homogen |
| Indeks apoptosis sel granulosa folikel tersier | 0.059 | Homogen |

Berdasarkan pada hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada tabel 5.3 diatas ditunjukkan bahwa pada variabel jumlah sel granulosa folikel tersier didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada variabel tersebut tidak terpenuhi dan diperlukan proses transformasi data. Sedangkan pada pada variabel jumlah sel granulosa folikel primer, sekunder, indeks apoptosis folikel primer, sekunder dan tersier didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada variabel tersebut telah terpenuhi.

Salah satu transformasi data yang dapat diterapkan adalah dengan transformasi logaritma natural ($\ln(Y)$). Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada data jumlah sel granulosa yang telah ditransformasi :

Tabel 5.4. Uji Asumsi Homogenitas Ragam Variabel Jumlah Sel Granulosa yang Telah Ditransformasi

| Variabel | Koefisien | p-value | Keterangan |
|--------------------------------------|-----------|---------|---------------|
| Jumlah Sel Granulosa folikel tersier | 4.163 | 0.019 | Tidak Homogen |



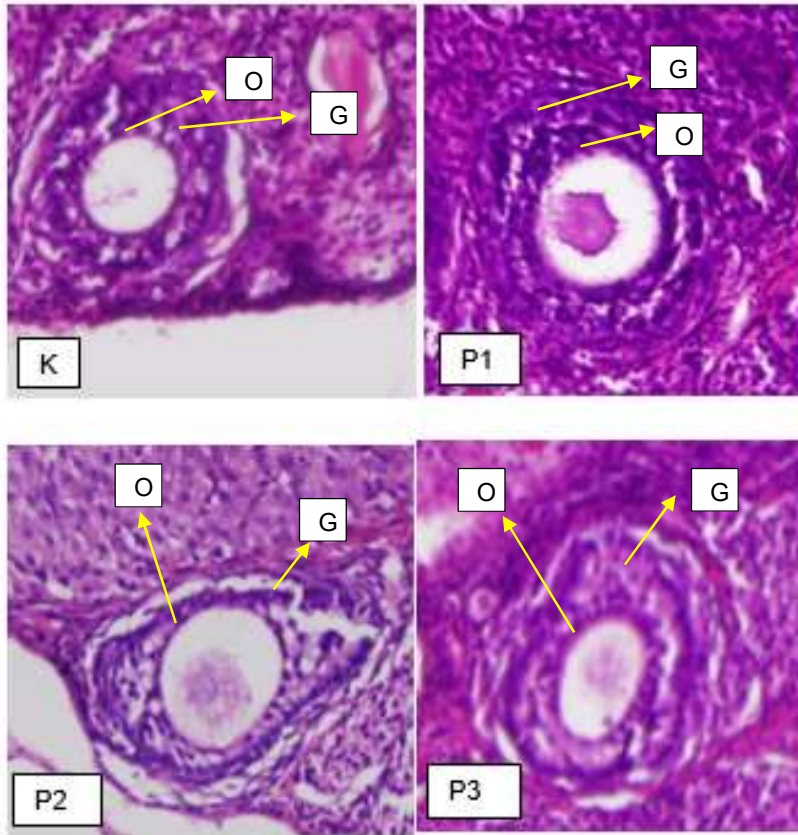
Berdasarkan tabel 5.4 di atas, hasil uji asumsi homogenitas ragam pada variabel jumlah sel granulosa folikel tersier yang telah ditransformasi didapatkan p-value kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) yang menunjukkan bahwa asumsi homogenitas ragam pada variabel jumlah sel granulosa tidak terpenuhi meskipun telah dilakukan transformasi data. Oleh karena itu, proses pengujian secara statistik pada variabel kadar jumlah sel granulosa folikel tersier dilakukan dengan menggunakan *one way ANOVA* dengan menggunakan uji lanjut uji Tamhane.

5.3 Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel

Sel granulosa merupakan sel berbentuk kuboid yang berada di sekeliling antrum dan oosit serta terletak di membran basalis (Look, 2011; Sadler, 2009). Berikut ini merupakan gambar sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis yang diambil dari pengecatan HE kemudian discan menggunakan mikroskop dot slide Olympus XC dilanjutkan dengan penghitungan jumlah sel granulosa folikel tersier dengan software Fiji.



5.3.1 Folikel Primer



Gambar 5.2 Sel granulososa folikel primer kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan HE dengan pembesaran 200 kali

Keterangan: K. Kelompok kontrol; P1. Kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB memiliki sel granulososa lebih banyak daripada kelompok kontrol; P2. Kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB memiliki sel granulososa lebih banyak daripada kelompok P1; P3. Kelompok perlakuan dosis 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulososa paling banyak. G: Sel Granulososa; O: Oosit.

Berdasarkan gambar 5.2 diatas, maka kelompok kontrol memiliki jumlah sel granulososa paling sedikit dibanding semua kelompok perlakuan. Kelompok dosis 10 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulososa lebih banyak dibanding kelompok kontrol, kelompok dosis 15 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulososa lebih banyak dibanding kelompok dosis 10 mg/kgBB dan kelompok 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulososa paling banyak dibanding seluruh kelompok.

Variabel jumlah sel granulososa folikel primer telah memenuhi syarat *One way ANOVA*, maka dilakukan pengujian *One Way Anova* diikuti uji *LSD*.



Berikut ini hasil pengujian pengaruh paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel primer.

TABEL 5.5 Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer dengan *one way Anova*

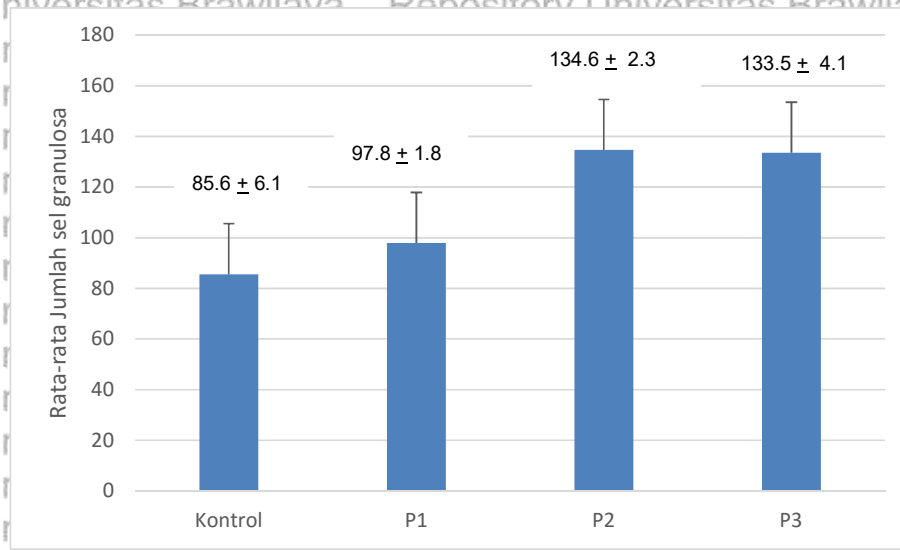
| Perlakuan | Mean \pm SD | <i>p-value</i> |
|-----------|--------------------|----------------|
| Kontrol | 85.6 \pm 6.1 a | |
| P1 | 97.8 \pm 1.8 a | |
| P2 | 134.6 \pm 2.38 a | 0.865 |
| P3 | 133.5 \pm 4.1 a | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan tabel 5.5 diatas, hasil analisis dengan *one way ANOVA* maka didapat *p-value* sebesar 0.865 lebih besar dari 0.05 ($p < 0.05$), sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel primer. Atau dengan kata lain, terdapat tidak ada perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa folikel primer antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Pada perbandingan antar kelompok, ditunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel granulosa antar kelompok tidak berbeda signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok baik kontrol, P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang sama. Rata-rata jumlah sel granulosa paling rendah didapatkan pada kelompok kontrol. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki rata-rata jumlah sel granulosa paling rendah.

Berikut histogram rata-rata jumlah sel granulosa folikel primer:

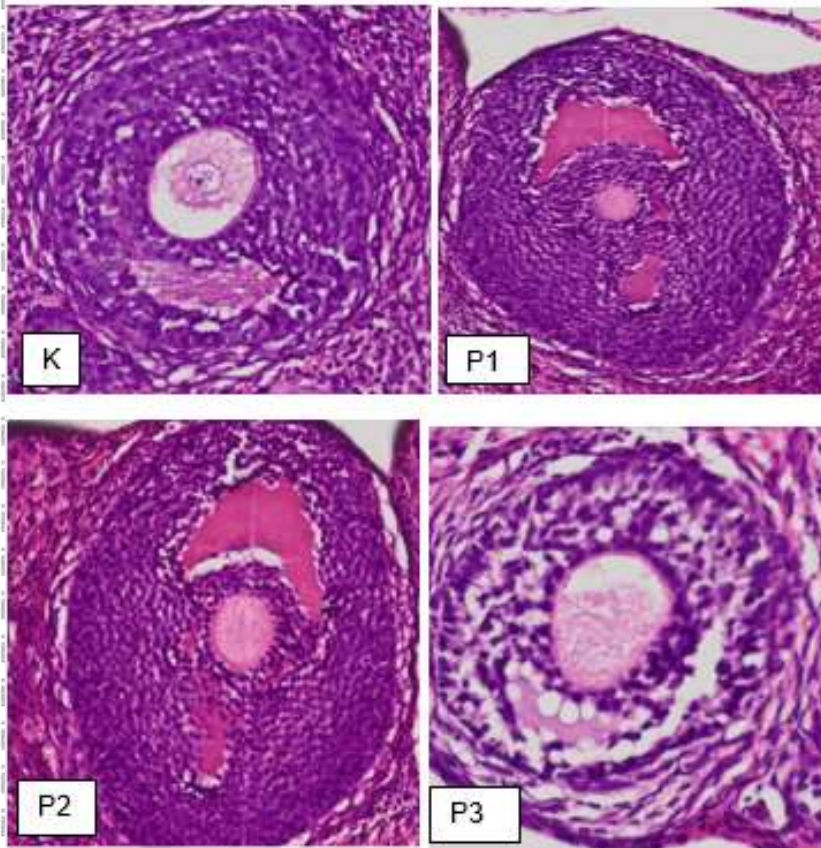


Gambar 5.3. Histogram Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

Pada Gambar 5.3 ditunjukkan histogram rata-rata jumlah sel granulosa folikel primer semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata jumlah sel granulosa meningkat pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata jumlah sel granulosa terendah didapatkan pada kelompok kontrol.



5.3.2 Folikel Sekunder



Gambar 5.4 Sel granulosa folikel sekunder kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan HE dengan pembesaran 200 kali

Keterangan: K: Kelompok kontrol; P1: Kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB memiliki sel granulosa lebih banyak daripada kelompok kontrol; P2: Kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB memiliki sel granulosa lebih banyak daripada kelompok P1; P3: Kelompok perlakuan dosis 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa paling banyak.

Berdasarkan gambar 5.4 diatas, maka kelompok kontrol memiliki jumlah sel granulosa paling sedikit dibanding semua kelompok perlakuan. Kelompok dosis 10 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa lebih banyak dibanding kelompok kontrol, kelompok dosis 15 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa lebih banyak dibanding kelompok dosis 10 mg/kgBB dan kelompok 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa paling banyak dibanding seluruh kelompok.



Variabel jumlah sel granulosa folikel sekunder telah memenuhi syarat *One way ANOVA*, maka dilakukan pengujian *One Way Anova* diikuti uji *LSD*.

Berikut ini hasil pengujian pengaruh paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel sekunder.

TABEL 5.6 Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder dengan *One Way Anova*

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|---------------------------------|---------|
| Kontrol | 287.4 \pm 17.22 ^d | 0.000 |
| P1 | 247.5 \pm 8.90 ^c | |
| P2 | 216.2 \pm 9.5 ^b | |
| P3 | 169.92 \pm 15.34 ^a | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

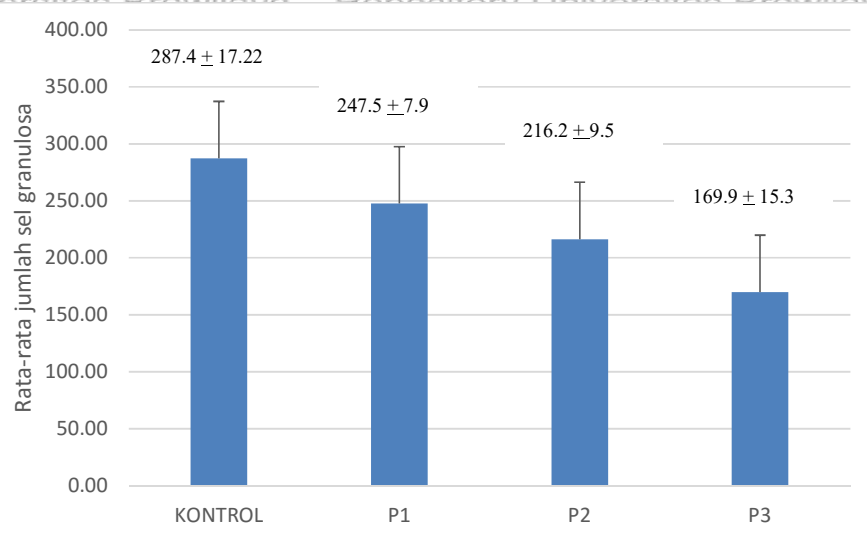
Berdasarkan tabel 5.6 hasil analisis dengan menggunakan *ANOVA*, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0.05$ ($p < 0.05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel tersier. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.

Pada perbandingan antara kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel granulosa antar kelompok perlakuan berbeda signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang berbeda. Rata-rata jumlah sel granulosa folikel sekunder paling rendah didapatkan pada kelompok P3. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan paparan Sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata jumlah sel granulosa paling rendah.



Rata-rata jumlah sel granulosa kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

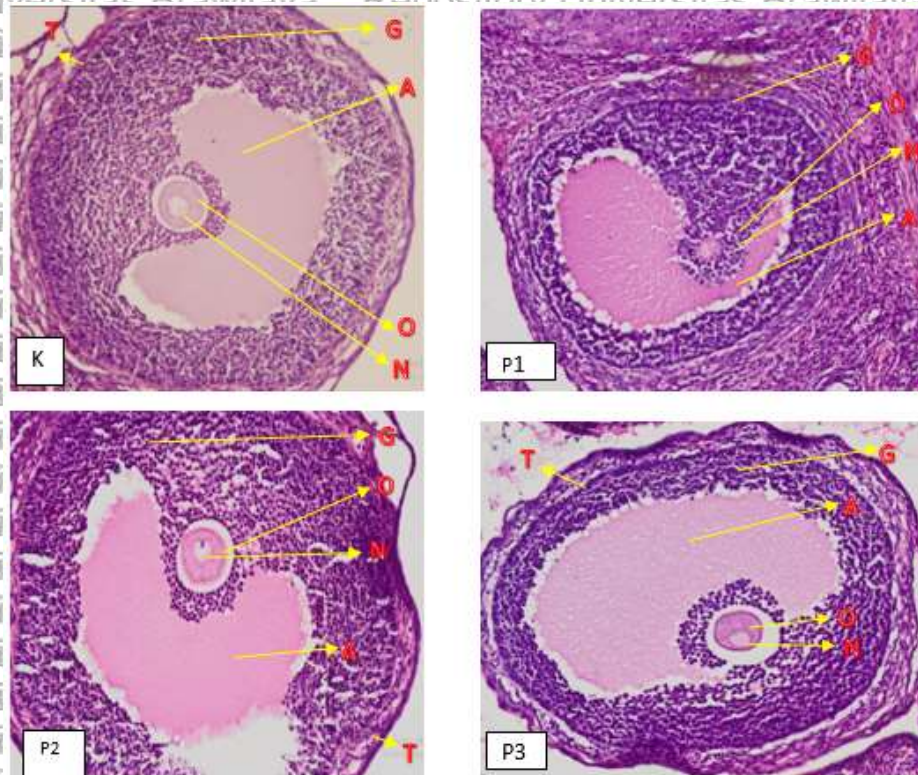


Gambar 5.5. Histogram Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

Pada Gambar 5.5 ditunjukkan histogram rata-rata jumlah sel granulosa folikel sekunder semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata jumlah sel granulosa menurun pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata jumlah sel granulosa terendah didapatkan pada kelompok perlakuan paparan sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3).



5.3.3 Folikel Tersier



Gambar 5.6 Sel granulosa folikel tersier kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan pewarnaan HE dengan pembesaran 200 kali

Keterangan : K: Kelompok kontrol, P1: Kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB memiliki sel granulosa lebih sedikit dibanding kelompok kontrol; P2: Kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa lebih sedikit dibanding kelompok P1; P3: Kelompok perlakuan dosis 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa paling sedikit daripada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya.; A: Antrum; G: Sel Granulosa; O: Oosit; N: Nukleus; T: Sel Theca.

Berdasarkan gambar 5.6 diatas, maka kelompok kontrol memiliki jumlah sel granulosa paling banyak dibanding semua kelompok perlakuan, sedangkan kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa lebih sedikit dibanding kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa lebih sedikit dibanding kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB dan kelompok dosis 20 mg/kgBB memiliki jumlah sel granulosa paling sedikit dibanding seluruh kelompok.



Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas ragam, variabel Jumlah Sel Granulosa telah terpenuhi asumsi normalitas namun tidak terpenuhi asumsi homogenitas ragam.

Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel tersier dengan menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tamhane. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Paparan Sipermetrin terhadap Jumlah Sel Granulosa dengan menggunakan ANOVA dan uji Tamhane 5%.

Tabel 5.7. Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah Sel Granulosa dengan *One Way Anova* dan Uji Tamhane 5%

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|---------------------------------|---------|
| Kontrol | 308.07 \pm 27.03 ^d | 0.000 |
| P1 | 248.1 \pm 7.80 ^c | |
| P2 | 210.73 \pm 10.66 ^b | |
| P3 | 148.58 \pm 9.09 ^a | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan tabel 5.7, hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0.05$ ($p < 0,05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel tersier. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.

Berdasarkan pada hasil uji Tamhane 5 % pada Tabel 5.7 di atas, pada perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunan jumlah sel ganulosa secara signifikan didapatkan pada semua kelompok perlakuan, baik P1, P2, maupun P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-

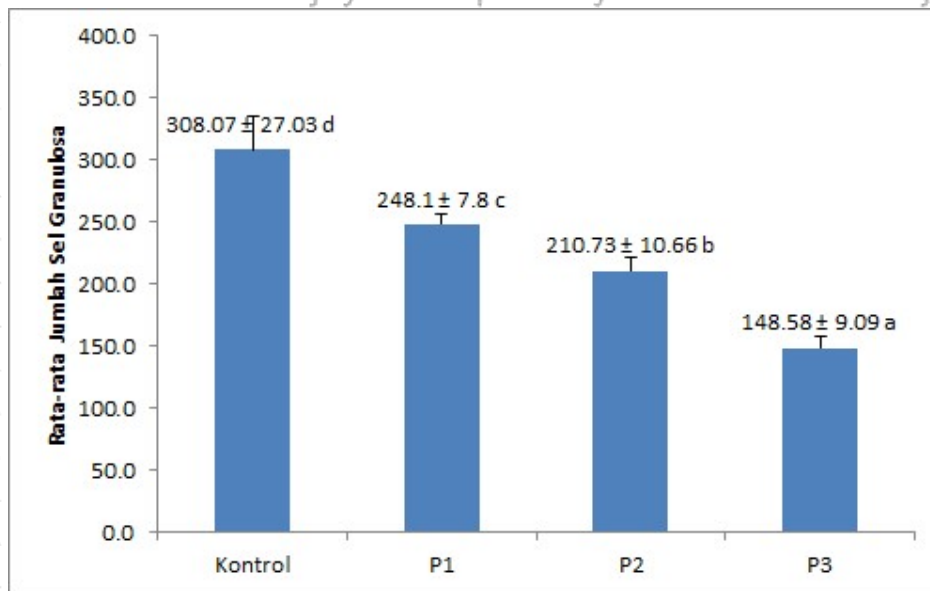


rata \pm sd kelompok kontrol lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan.

Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa paparan sipermetrin dengan berbagai dosis terbukti mampu menurunkan jumlah sel granulosa folikel tersier.

Pada perbandingan antara kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel granulosa antar kelompok perlakuan berbeda signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang berbeda. Rata-rata jumlah sel granulosa paling rendah didapatkan pada kelompok P3. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan paparan Sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata jumlah sel granulosa paling rendah.

Rata-rata jumlah sel granulosa kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.7. Histogram Rata-Rata Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

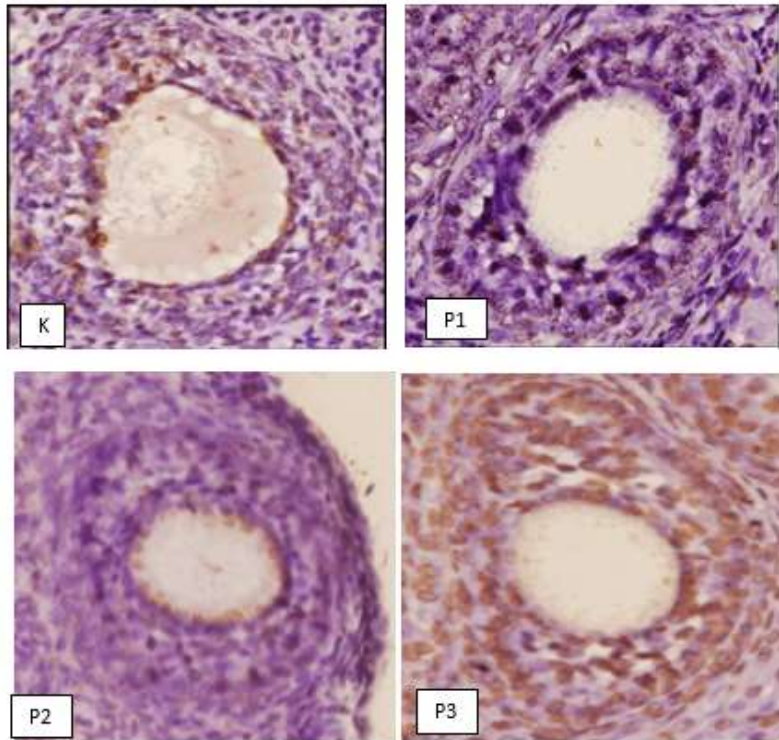


Pada Gambar 5.7 ditunjukkan histogram rata-rata jumlah sel granulosa folikel tersier semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata jumlah sel granulosa menurun pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata jumlah sel granulosa terendah didapatkan pada kelompok perlakuan paparan sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3).

5.4 Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis

Indeks apoptosis merupakan satuan yang digunakan untuk menghitung jumlah sel yang apoptosis pada 1000 sel (Bhardwaj dan Wani, 2015). Berikut ini merupakan gambar sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier yang mengalami apoptosis berdasarkan pemeriksaan TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase – mediated dUTP Nick end Labelling*) pada berbagai kelompok.

5.4.1 Folikel Primer



Gambar 5.8 Apoptosis pada sel granulosa folikel primer pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan TUNEL assay dengan pembesaran 400 kali

Keterangan: K. Sel granulosa folikel primer kelompok kontrol menunjukkan paling sedikit mengalami apoptosis; P1. Sel granulosa folikel primer kelompok dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok kontrol; P2. Sel granulosa folikel primer kelompok dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok P1; P3. Sel granulosa folikel primer kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.

Berdasarkan gambar 5.8 diatas menunjukkan bahwa kelompok kontrol mengalami apoptosis paling sedikit, kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB, dan kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.



Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis sel granulosa folikel primer dengan menggunakan uji ANOVA dan Uji LSD 5%.

Tabel 5.8. Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer dengan Uji *One Way Anova* dan LSD 5%

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|-----------------------------|---------|
| Kontrol | 14.5 \pm 1.8 ^a | 0.000 |
| P1 | 18.5 \pm 1.7 ^b | |
| P2 | 20.8 \pm 1.3 ^c | |
| P3 | 22.3 \pm 1.3 ^d | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan tabel 5.8, hasil analisis dengan menggunakan *one way* ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

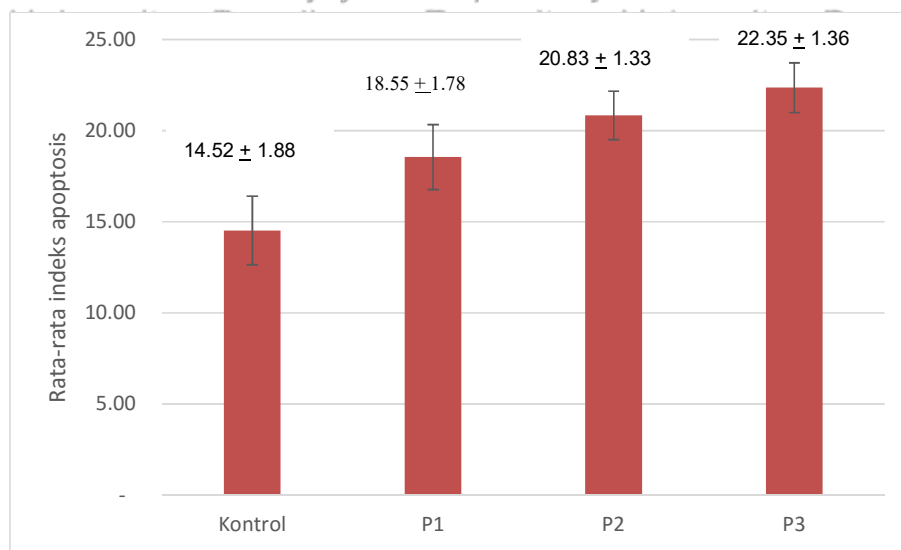
Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis sel granulosa folikel primer. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan indeks apoptosis antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5.8 di atas, pada perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan indeks apoptosis sel granulosa folikel primer secara signifikan didapatkan pada semua kelompok perlakuan, baik P1, P2, maupun P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok kontrol lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa paparan sipermetrin dengan berbagai dosis terbukti mampu meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa folikel primer.



Pada perbandingan antara kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa rata-rata indeks apoptosis antar kelompok perlakuan berbeda signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang berbeda. Rata-rata indeks apoptosis paling rendah didapatkan pada kelompok P3. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan paparan sipemetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel primer paling tinggi.

Rata-rata indeks apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

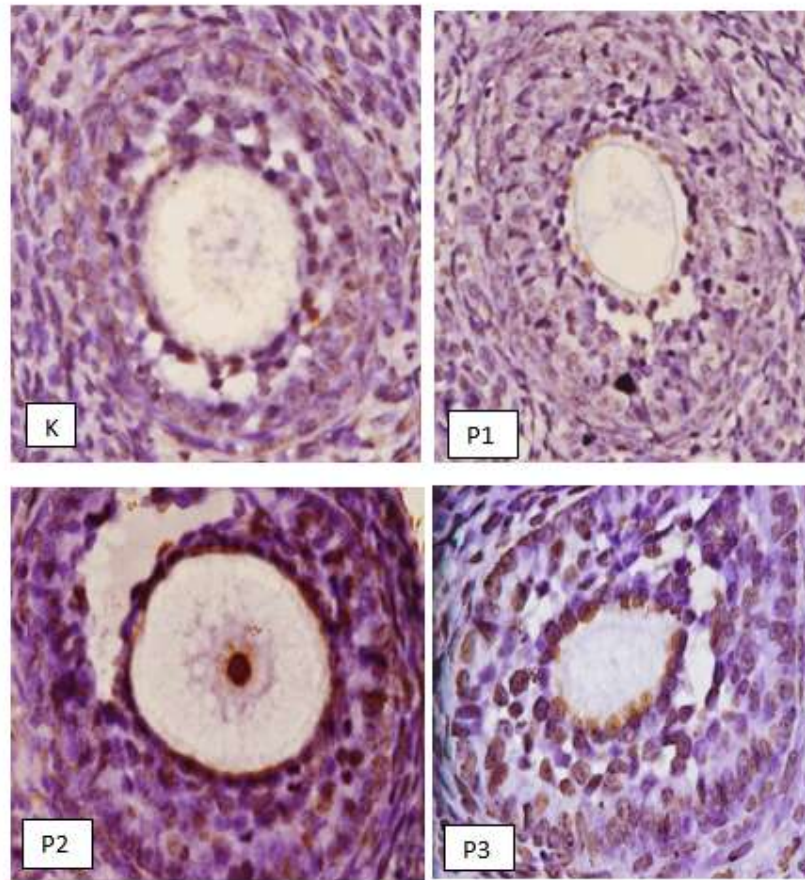


Gambar 5.9. Histogram Rata-Rata Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer

Pada Gambar 5.9 ditunjukkan histogram rata-rata indeks apoptosis semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel primer meningkat pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata indeks apoptosis tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan paparan sipemetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3).



5.4.2 Folikel Sekunder



Gambar 5.10 Apoptosis pada sel granulosa folikel sekunder pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan TUNEL assay dengan pembesaran 400 kali

Keterangan: K. Sel granulosa folikel sekunder kelompok kontrol menunjukkan paling sedikit mengalami apoptosis; P1. Sel granulosa folikel sekunder kelompok dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok kontrol; P2. Sel granulosa folikel sekunder kelompok dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok P1; P3. Sel granulosa folikel sekunder kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.

Berdasarkan gambar 5.10 diatas menunjukkan bahwa kelompok kontrol mengalami apoptosis paling sedikit, kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada



kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB, dan kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.

Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Paparan Sipermetrin terhadap indeks Apoptosis dengan menggunakan uji ANOVA dan Uji LSD 5%.

Tabel 5.9. Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis sel granulosa folikel sekunder dengan Uji *One Way Anova* dan LSD 5%

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|-------------------------------|---------|
| Kontrol | 15.82 \pm 2.43 ^a | 0.000 |
| P1 | 24.45 \pm 3.69 ^b | |
| P2 | 32 \pm 1.79 ^c | |
| P3 | 39 \pm 7.92 ^d | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan tabel 5.9, hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

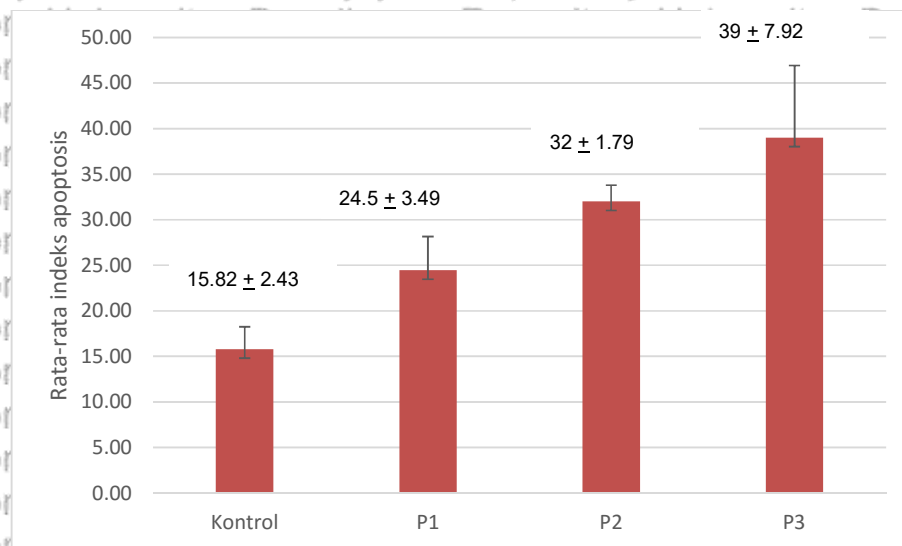
Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan indeks apoptosis antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5.9 di atas, pada perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan indeks apoptosis secara signifikan didapatkan pada semua kelompok perlakuan, baik P1, P2, maupun P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok kontrol lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa paparan sipermetrin dengan berbagai dosis terbukti mampu meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder.



Pada perbandingan antara kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa rata-rata indeks apoptosis antar kelompok perlakuan berbeda signifikan.

Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang berbeda. Rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder paling rendah didapatkan pada kelompok kontrol. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan paparan sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder paling tinggi. Rata-rata indeks apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :

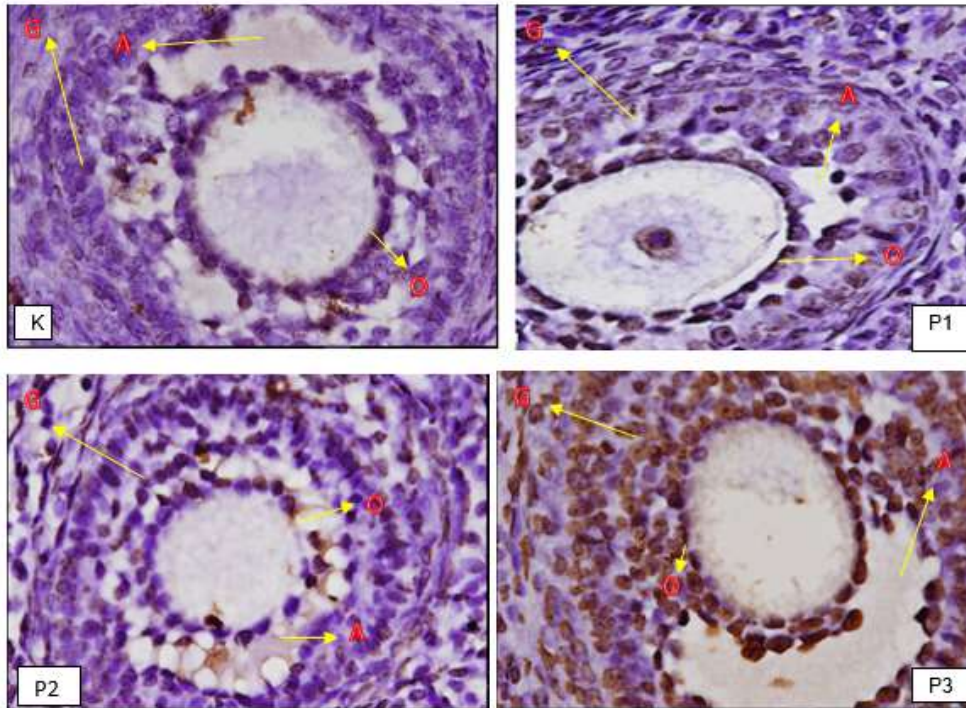


Gambar 5.11. Histogram rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel Sekunder

Pada Gambar 5.11 ditunjukkan histogram rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata indeks apoptosis meningkat pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata indeks apoptosis tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan paparan sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3).



5.4.3 Folikel Tersier



Gambar 5.12 Apoptosis pada sel granulosa folikel tersier pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan berbagai dosis menggunakan TUNEL assay dengan pembesaran 400 kali

Keterangan: K. Sel granulosa folikel tersier kelompok kontrol menunjukkan paling sedikit mengalami apoptosis; P1. Sel granulosa folikel tersier kelompok dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok kontrol; P2. Sel granulosa folikel tersier kelompok dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak dibanding kelompok P1; P3. Sel granulosa folikel tersier kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.

Berdasarkan gambar 5.12 diatas menunjukkan bahwa kelompok kontrol mengalami apoptosis paling sedikit, kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada kelompok kontrol, kelompok perlakuan dosis 15 mg/kgBB mengalami apoptosis lebih banyak daripada kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB, dan kelompok dosis 20 mg/kgBB mengalami apoptosis paling banyak dibanding semua kelompok.

Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian Paparan Sipermetrin terhadap indeks Apoptosis dengan menggunakan uji ANOVA dan Uji LSD 5%.



Tabel 5.10. Pengujian Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Indeks Apoptosis dengan Uji One Way Anova dan LSD 5%

| Perlakuan | Mean \pm SD | p-value |
|-----------|-------------------------------|---------|
| Kontrol | 19.32 \pm 1.58 ^a | 0.000 |
| P1 | 23.75 \pm 2.4 ^b | |
| P2 | 28.63 \pm 1.72 ^c | |
| P3 | 45.5 \pm 4.06 ^d | |

Keterangan: Pada rata-rata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan tabel 5.10, hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0.05$ ($p < 0,05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan indeks apoptosis antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.

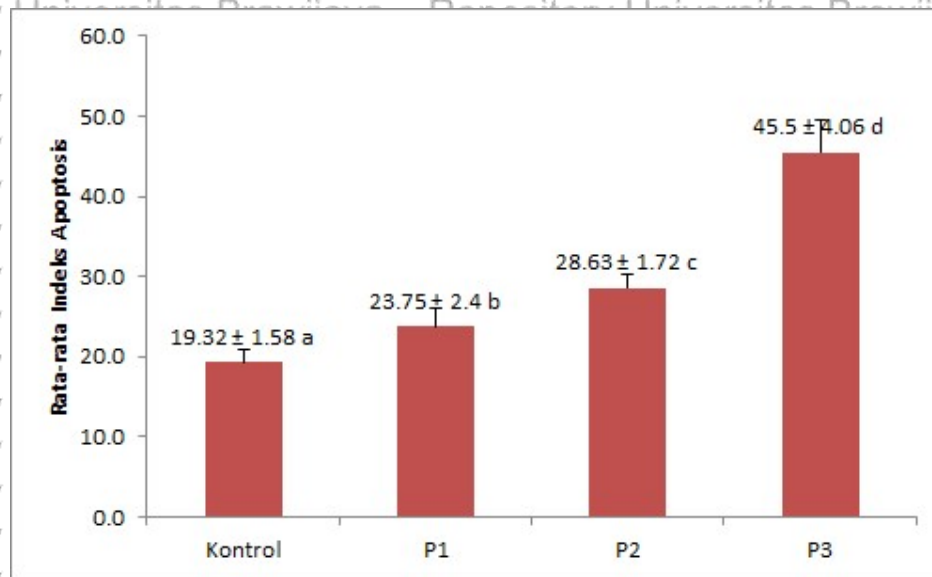
Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5.10 di atas, pada perbandingan antara kelompok kontrol (K) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa peningkatan indeks apoptosis secara signifikan didapatkan pada semua kelompok perlakuan, baik P1, P2, maupun P3. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok kontrol lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa paparan sipermetrin dengan berbagai dosis terbukti mampu meningkatkan indeks apoptosis.

Pada perbandingan antara kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa rata-rata indeks apoptosis antar kelompok perlakuan berbeda signifikan. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok perlakuan baik P1, P2, maupun P3 memuat huruf yang berbeda.



Rata-rata indeks apoptosis paling rendah didapatkan pada kelompok P3. Dari pengujian ini ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan paparan Sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata indeks apoptosis paling tinggi.

Rata-rata indeks apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.13. Histogram rata-rata indeks apoptosis sel granulosa folikel tersier

Pada Gambar 5.13 ditunjukkan histogram rata-rata indeks apoptosis semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok kontrol, terlihat bahwa rata-rata indeks apoptosis meningkat pada semua kelompok perlakuan, dimana rata-rata indeks apoptosis tertinggi didapatkan pada kelompok perlakuan paparan sipermetrin dengan dosis 20 mg/kgBB (P3).



5.5 Pengujian Regresi Pengaruh Paparan Sipermetrin Terhadap Jumlah sel granuloza dan Indeks apoptosis

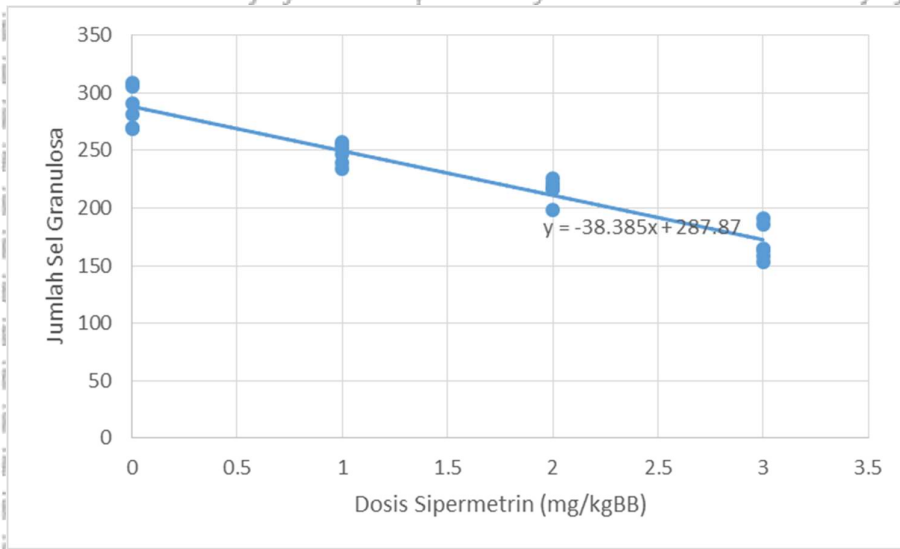
Untuk mengetahui pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granuloza dan indeks apoptosis, dapat dilakukan pengujian dengan menggunakan analisis analisis regresi. Berdasarkan hasil analisis, didapatkan hasil analisis regresi sebagai berikut :

Tabel 5.11. Hasil Analisis Regresi Jumlah sel granuloza dan Indeks Apoptosis

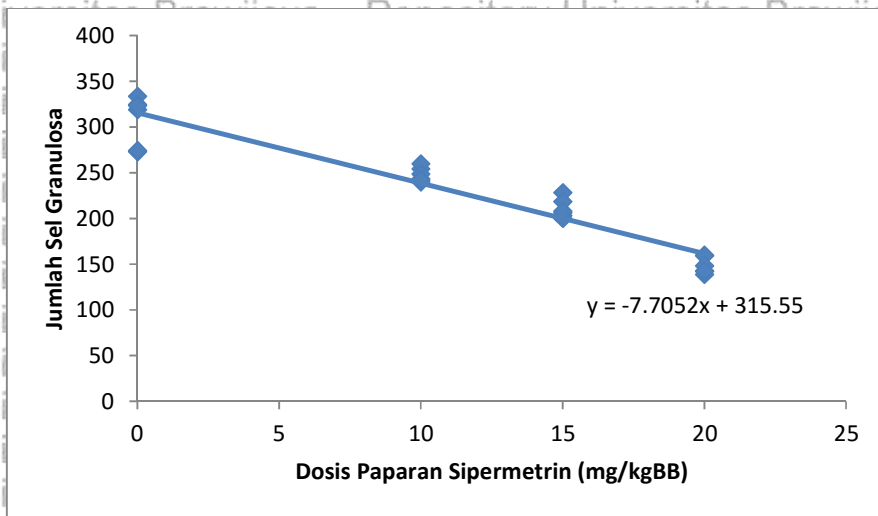
| Variabel Terikat | p-value | Koefisien Regresi | Korelasi dan p value | R square |
|---|---------|-------------------|------------------------|----------|
| Jumlah sel granuloza folikel sekunder | 0.000 | -5.69 | $r = -0.942$ p = 0.000 | 92.2 % |
| Jumlah Sel granuloza folikel tersier | 0.000 | -7.77 | $r = -0.955$ p = 0.000 | 91.2 % |
| Indeks apoptosis sel granuloza folikel primer | 0.000 | 0.39 | $r = 0.894$ p = 0.000 | 79.9 % |
| Indeks apoptosis sel granuloza folikel sekunder | 0.000 | 1.15 | $r = 0.88$ p = 0.000 | 79.1 % |
| Indeks apoptosis sel granuloza folikel tersier | 0.000 | 1.182 | $r = 0.856$ p = 0.000 | 73.35 % |



Berikut Scatter Plot hubungan antara pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa folikel :



Gambar 5.14 Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder



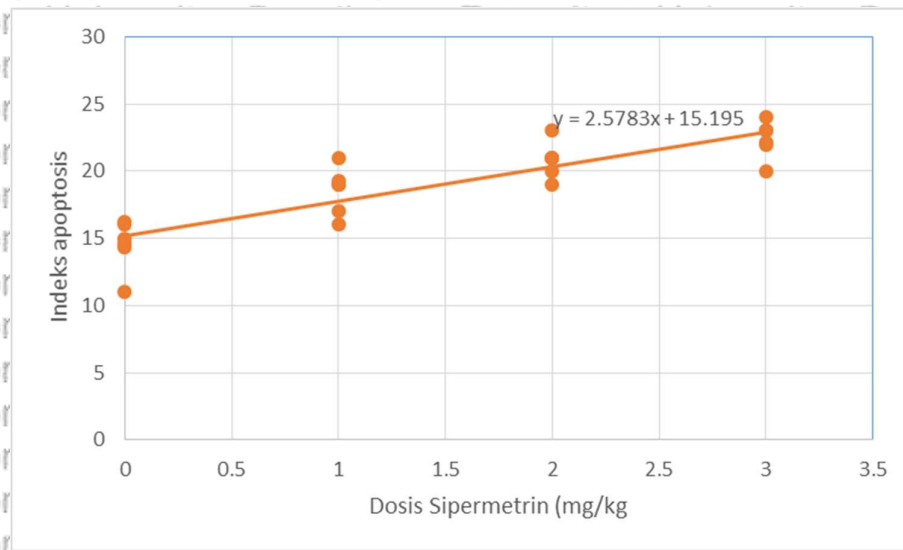
Gambar 5.15 Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

Berdasarkan hasil analisis regresi jumlah sel granulosa pada tabel 5.11 dan gambar 5.14, didapatkan koefisien regresi jumlah sel granulosa folikel sekunder sebesar -5.69 dengan p-value sebesar 0.000. Koefisien determinasi (R-

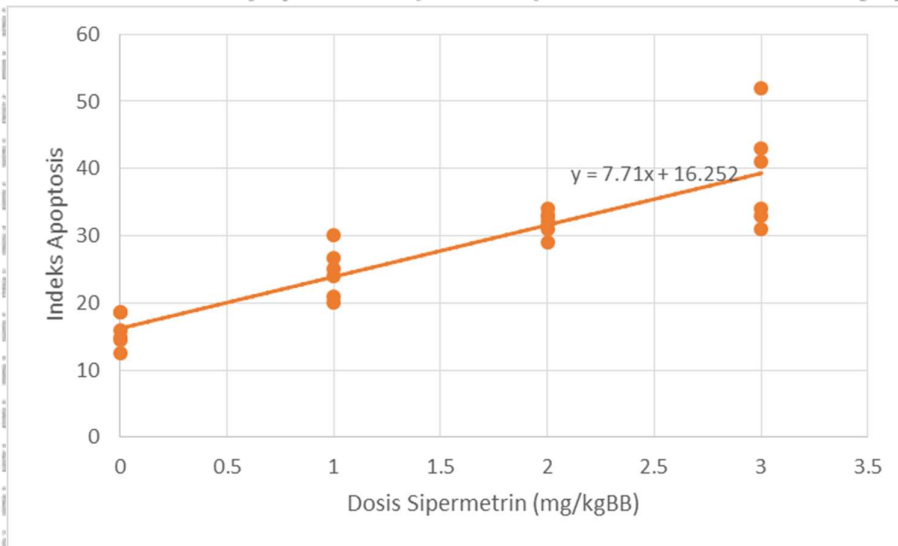


square) sebesar 92.2 % menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa sebesar 92.2 %. Pemberian paparan sipermetrin mampu mempengaruhi terhadap penurunan jumlah sel granulosa folikel primer sebesar 92.2%. Koefisien regresi sebesar -569 mengandung pengertian bahwa jika dosis pemberian paparan sipermetrin ditingkatkan, setiap penambahan dosis sebesar 1 mg/kgBB diprediksi mampu menurunkan jumlah sel granulosa sebesar 5.69.

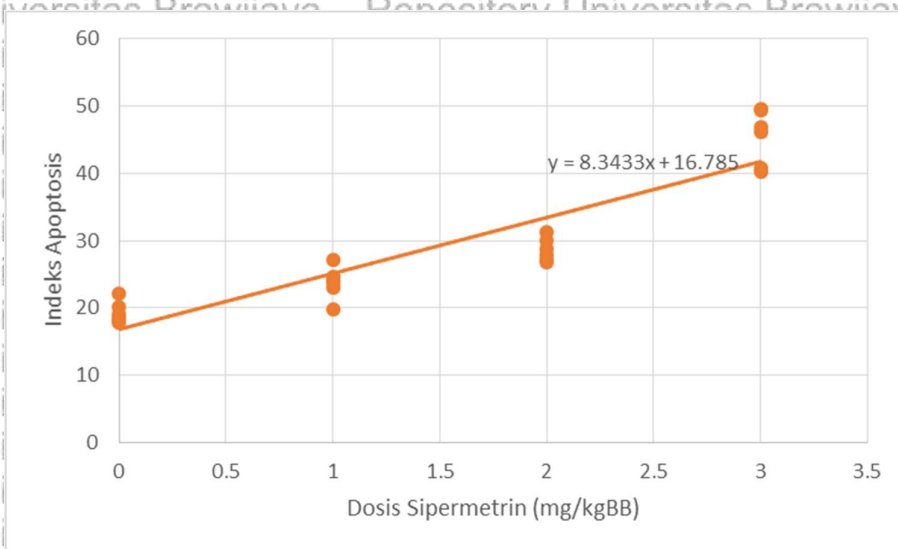
Berikut scatter Plot hubungan antara pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis sel granulosa folikel :



Gambar 5.16 Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer



Gambar 5.17 Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder



Gambar 5.18 Scatter Plot Pengaruh Paparan Sipermetrin terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier

Berdasarkan hasil analisis regresi indeks apoptosis pada tabel 5.11 dan gambar 5.14, didapatkan koefisien regresi indeks apoptosis sel granulosa folikel primer sebesar 0.39 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R^2) sebesar 79.9% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap Indeks apoptosis sebesar



79.9%. Pemberian paparan sipermetrin mampu berpengaruh terhadap peningkatan Indeks apoptosis sebesar 79.9%. Koefisien regresi bernilai 0.39 mengandung pengertian bahwa jika dosis pemberian paparan sipermetrin ditingkatkan, setiap penambahan dosis sebesar 1 mg/kgBB diprediksi mampu meningkatkan Indeks apoptosis sebesar 0.39.

Berdasarkan hasil analisis regresi indeks apoptosis pada tabel 5.11, didapatkan koefisien regresi indeks apoptosis sel granulosa folikel sekunder sebesar 1.15 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 79.1% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap Indeks apoptosis sebesar 79.1%. Pemberian paparan sipermetrin mampu berpengaruh terhadap peningkatan Indeks apoptosis sebesar 79.1%. Koefisien regresi bernilai 1.15 mengandung pengertian bahwa jika dosis pemberian paparan sipermetrin ditingkatkan setiap penambahan dosis sebesar 1 mg/kgBB diprediksi mampu meningkatkan Indeks apoptosis sebesar 1.15.

Sedangkan koefisien regresi jumlah sel granulosa folikel tersier sebesar -7.77 dengan p-value sebesar 0.000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 91.2 % menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap jumlah sel granulosa sebesar 91.2%. Pemberian paparan sipermetrin mampu mempengaruhi terhadap penurunan jumlah sel granulosa folikel primer sebesar 91.2%.

Berdasarkan hasil analisis regresi indeks apoptosis pada tabel 5.11, didapatkan koefisien regresi sebesar 1.182 dengan p-value sebesar 0,000. Koefisien determinasi (R-square) sebesar 73.35% menunjukkan bahwa keragaman data yang dijelaskan oleh pengaruh pemberian paparan sipermetrin terhadap Indeks apoptosis sebesar 73.35%. Pemberian paparan sipermetrin mampu berpengaruh terhadap peningkatan Indeks apoptosis sebesar 73.35%.



Sisanya sebesar 26,65% dijelaskan oleh faktor lain yang tidak terlibat dalam penelitian. Koefisien regresi bernilai 1,182 mengandung pengertian bahwa jika dosis pemberian paparan sipermetrin ditingkatkan, setiap penambahan dosis sebesar 1 mg/kgBB diprediksi mampu meningkatkan Indeks apoptosis sebesar 1,182.

**BAB 6****PEMBAHASAN**

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap penurunan jumlah sel granulosa dan peningkatan indeks apoptosis sel granulosa folikel tikus betina galur wistar. Selain variabel tersebut, terdapat karakteristik data umum yaitu berat badan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, rata-rata berat badan tikus selama proses penelitian cenderung mengalami peningkatan.

Sedangkan pada kelompok P1 (dosis 10 mg/kgBB), P2 (dosis 15 mg/kgBB), dan P3 (dosis 20 mg/kgBB) memiliki tren yang lebih fluktuatif. Kelompok tikus yang diberikan paparan sipermetrin cenderung mengalami gangguan pertumbuhan, terutama dari minggu ke-3 menuju ke minggu ke-4, semua kelompok perlakuan memiliki pertumbuhan yang negatif. Selama penelitian, rata-rata berat badan tikus pada minggu ke-0 hingga minggu ke-3 pada semua kelompok tidak ada perbedaan secara signifikan (p value $> 0,05$). Menurut Sayim *et al* (2005), hasil metabolisme sipermetrin 99% dieliminasi keluar tubuh dalam beberapa jam dan sisanya 1% disimpan dalam lemak tubuh kemudian dieliminasi secara perlahan dalam 18 hari. Hal ini diduga dapat menyebabkan perubahan berat badan tikus mengalami pertumbuhan fluktuatif seiring dengan usia tikus pada penelitian ini.

Menurut peneliti, perubahan berat badan tikus secara fluktuatif minggu ke 0 – 3 pada semua kelompok perlakuan penelitian ini disebabkan karena sipermetrin mempunyai sifat lipofilik dan hasil metabolisme sipermetrin dapat tersimpan di jaringan lemak selama 18 hari. Selain itu, paparan sipermetrin belum memberi efek toksik pada tikus selama minggu ke 0-3 masa penelitian karena tikus dapat beradaptasi dengan paparan sipermetrin.



Pada minggu ke-4, rata-rata berat badan tikus berbeda signifikan dimana kelompok kontrol memiliki rata-rata berat badan yang lebih tinggi daripada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan pendapat Lakkawar *et al* (2014) bahwa paparan sipermetrin dapat menurunkan berat badan kelinci. Pendapat yang sama dikemukakan Hussain *et al* (2009), kelompok tikus yang dipapar sipermetrin mengalami penurunan berat badan dibanding kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Sangha (2010) yang membuktikan bahwa sipermetrin dosis 50 mg/kgBB dapat menurunkan berat badan tikus pada minggu keempat perlakuan. Grewal (2010) juga membuktikan bahwa terjadi penurunan berat badan pada tikus yang dipapar sipermetrin selama 30 hari.

Menurut peneliti, penurunan berat badan pada minggu minggu ke – 4 pada penelitian ini disebabkan karena paparan sipermetrin dosis rendah dapat menyebabkan toksisitas ringan, yaitu berupa diare, penurunan nafsu makan dan banyak kotoran pada mata. Pada penelitian ini, gejala toksisitas ringan ini muncul pada hari ke – 22 sampai hari ke – 28 pada kelompok dosis 15 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB. Efek toksik ringan sipermetrin ini diduga dapat menyebabkan penurunan berat badan tikus pada minggu ke-4.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian teoritik diatas, maka paparan sipermetrin dosis rendah per oral tidak menyebabkan penurunan berat badan tikus secara signifikan.

6.1 Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per Oral Terhadap Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer, Sekunder dan Tersier

Sel granulosa merupakan sel yang berasal dari permukaan epitel ovarium (Strauss dan Barbieri, 2013). Pada proses maturasi folikel, bagian folikel yang mengalami perubahan adalah sel theca dan sel granulosa.

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.865 lebih besar daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$);



Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa folikel primer antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan. Pada rata-rata jumlah sel granulosa folikel primer kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB, 15 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB terdapat kenaikan yang tidak bermakna pada seluruh kelompok.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Hutt (2007) bahwa pertumbuhan sel granulosa pada folikel primer tidak dipengaruhi oleh faktor hormon diluar ovarium. Penelitian Krishna (2000) juga membuktikan bahwa pertumbuhan folikel primer juga tidak dipengaruhi oleh *Follicle stimulating hormone*. Pengaturan pertumbuhan sel granulosa di folikel primer dipengaruhi oleh interaksi antara oosit, sel granulosa dan produksi *local growth factor*. Estradiol dibutuhkan untuk proliferasi sel granulosa dan folikel primer agar dapat tumbuh dan bertahan hidup (Hanrahan *et al*, 2004). Penelitian yang dilakukan Hamdani (2017) menunjukkan bahwa sipermetrin dapat menurunkan jumlah folikel primer, sekunder dan tersier.

Menurut peneliti, paparan sipermetrin dapat menyebabkan proliferasi sel granulosa folikel primer karena sipermetrin memiliki efek menyerupai estrogen, dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen di ovarium sehingga folikel primer dapat tumbuh dan sel granulosa folikel primer tetap berproliferasi. Disamping itu, pertumbuhan folikel primer tidak dipengaruhi FSH, jadi paparan sipermetrin berbagai dosis tidak menyebabkan perbedaan yang bermakna pada jumlah sel granulosa folikel primer.

Berdasarkan pada hasil analisis jumlah sel granulosa sekunder dan tersier dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel granulosa folikel sekunder dan tersier antar kelompok, baik kelompok kontrol maupun perlakuan.



Hasil penelitian ini sejalan dengan pendapat Orisaka *et al* (2009), sel granulosa dapat berproliferasi dibawah pengaruh estrogen, FSH dan reseptor FSH. Proliferasi sel granulosa pada folikel sekunder dan tersier dipengaruhi oleh FSH. Penelitian Pavlik *et al* (2011) membuktikan bahwa FSH berperan dalam pematangan folikel, merangsang sintesis dan sekresi estrogen dan merangsang ekspresi reseptor LH di sel granulosa. Estrogen memiliki peran dalam peningkatan ekspresi reseptor FSH dan reseptor LH. Kerja estrogen di ovarium dimediasi oleh reseptor estrogen (Pelletier dan Alfy, 2000). Adanya penurunan jumlah sel granulosa pada folikel sekunder dan tersier pada semua kelompok dosis perlakuan dapat disebabkan karena struktur kimia sipermetrin menyerupai 17β estradiol dan memiliki sifat menyerupai estrogen serta dapat berikatan dengan reseptor estrogen, sehingga menurunkan biosintesis steroid di ovarium. Hal ini sesuai dengan penelitian Das *et al* (2016) yang menjelaskan bahwa tikus yang dipapar sipermetrin selama 14 hari berturut-turut dapat menurunkan serum FSH, LH dan estradiol. Menurut Tesone (2009), penurunan serum FSH dapat menurunkan aktivitas FSH *dependent* aromatase, sehingga menghambat proliferasi sel granulosa. Cote *et al* (2014) menjelaskan bahwa sipermetrin masuk melalui oral kemudian diabsorpsi dalam saluran pencernaan kemudian didistribusikan melalui peredaran darah dan terakumulasi di jaringan lipid dalam bentuk isomer *cis* dan *trans*. Di dalam peredaran darah, sipermetrin dapat menembus sawar otak sehingga bisa mengganggu sistem saraf (Wakeling *et al*, 2012). Sipermetrin dapat menurunkan neurotransmitter yang dibutuhkan untuk meneruskan rangsangan hipotalamus mensekresi GnRH (Gold, 2011). Dalam penelitian terhadap hewan coba menunjukkan bahwa konsentrasi hasil metabolit sipermetrin di otak tikus mencapai puncaknya pada 2–3 jam setelah paparan secara oral kemudian turun secara perlahan-lahan (EPA, 2006).



Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sel grahulosa folikel tersier yang mengalami penurunan paling banyak terjadi pada kelompok dosis 20 mg/kgBB.

Hal ini menunjukkan bahwa sifat sipermetrin sebagai *xenoestrogen* yang terakumulasi banyak didalam tubuh dapat menstimulasi umpan balik negatif sekresi gonadotropin, sehingga merangsang kelenjar hipofise anterior untuk menghentikan sekresi FSH dan mulai mensekresi LH. Dengan terhentinya sekresi FSH, maka tidak terjadi proliferasi sel granulosa. Hal ini sesuai dengan pendapat Bretveld *et al* (2006) yang menjelaskan bahwa pestisida yang memiliki efek seperti hormon estrogen dapat menimbulkan umpan balik negatif pada sekresi gonadotropin, sehingga menekan produksi estrogen endogen. Sejalan dengan penelitian Elbetieha (2001) menjelaskan bahwa sipermetrin dapat menyebabkan penurunan kadar FSH dan LH pada tikus. Hamdani *et al* (2017) membuktikan bahwa sipermetrin juga dapat menurunkan kadar 17- β estradiol di ovarium. Paparan sipermetrin diduga mengganggu sekresi gonadotropin dan berefek toksik pada steroidogenesis ovarium. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan Sangha *et al* (2012) menunjukkan bahwa pemberian sipermetrin dengan dosis 50 mg/kgBB dapat menurunkan konsentrasi lipid, phospholipid dan kolesterol di ovarium sehingga hal tersebut mengindikasikan adanya penurunan aktivitas steroid pada folikel. Menurut Wellington (2004), penurunan aktivitas steroid pada folikel yang mengalami atresi dapat menyebabkan hilangnya membran intraseluler pada jaringan yang mengalami degenerasi.

Menurut peneliti, penurunan jumlah sel granulosa folikel sekunder dan tersier pada penelitian merupakan efek sipermetrin sebagai *endocrine disruptor* yang memiliki efek sebagai *xenoestrogen* dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen di ovarium. *Xenoestrogen* yang tinggi dalam ovarium menyebabkan umpan balik negatif pada hiofise anterior untuk menghambat sekresi FSH.



Dengan terhambatnya sekresi FSH, maka terjadi penurunan jumlah sel granulosa pada folikel sekunder dan tersier.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian teoritik diatas, maka paparan sipermetrin dosis rendah per oral tidak terbukti menurunkan jumlah sel granulosa pada folikel primer, sedangkan hipotesis peneliti yang menyatakan paparan sipermetrin dosis rendah per oral dapat menurunkan jumlah sel granulosa pada folikel sekunder dan tersier telah terbukti.

6.2 Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per Oral Terhadap Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer, Sekunder dan Tersier

Pengamatan sel dibawah mikroskop dengan melihat ciri morfologi kondensasi kromatin, fragmentasi inti sel, bentuk sel menyusut, terbentuk tonjolan pada membran plasma, merupakan *gold standard* untuk menentukan suatu sel mengalami apoptosis (Henery *et al*, 2008). Satuan untuk menentukan jumlah sel yang apoptosis pada suatu jaringan dinyatakan dalam satuan indeks apoptosis (Renehan *et al*, 2001).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian paparan sipermetrin terhadap indeks apoptosis. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Berdasarkan uji LSD 5 %, pada indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier maka kelompok perlakuan dengan dosis 20 mg/kgBB pada memiliki indeks apoptosis paling tinggi dibanding kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dosis 10 mg/kgBB dan 15 mg/kgBB.



Hasil penelitian ini diperkuat dengan pendapat McCharty (2005) yang menjelaskan bahwa sipermetrin dimetabolisme di liver dan hasil metabolisme tersebut berupa *3-phenoxybenzyl alcohol*, *3-(4-hydroxy-3-phenoxy) benzyl alcohol*, dan *3-phenoxybenzaldehyde*. Selama proses metabolisme, sipermetrin membentuk *cyanohydrines* yang kemudian terurai menjadi *cyanides* dan *aldehydes* (Idris *et al*, 2012). *Cyanohydrines* ini merupakan substansi pada sipermetrin yang menginduksi *reactive oxygen species* (Wielgomas dan Krechniack, 2007). Peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dapat meningkatkan lipid peroksidase dan konsentrasi kalsium sitosol sehingga memicu kerusakan sel dan gen (Duru *et al*, 2000). Peningkatan indeks apoptosis sel granulosa folikel tersier secara signifikan pada semua kelompok perlakuan (dosis 10 mg/kgBB, 15 mg/kgBB dan 20 mg/kgBB) disebabkan karena tingginya radikal bebas di dalam sel granulosa yang melebihi kapasitas penangkapan oleh antioksidan, sehingga menimbulkan stres oksidatif. Dengan adanya peningkatan stres oksidatif memicu peningkatan apoptosis di sel granulosa. Menurut McQueen (2010), apoptosis pada sel granulosa folikel antral dikontrol oleh hormon melalui sinyal parakrin atau autokrin. Penelitian tilly dan tilly (1995) menjelaskan bahwa enzim antioksidan (*N-acetyl cystein*, SOD, catalase, *ascorbic acid*) dapat mencegah apoptosis. Hasil penelitian Kalra *et al* (2016) menunjukkan bahwa sipermetrin dapat menurunkan enzim antioksidan, yaitu CAT, GR, GPx, SOD dan enzim GST di ovarium. Hal ini memicu terjadinya *reactive oxygen species* (ROS) di ovarium. Menurut Sinha *et al* (2013), ROS berperan dalam menginduksi apoptosis pada kondisi fisiologis maupun patologis dan akumulasi ROS yang diikuti apoptosis yang berlebihan dapat menyebabkan suatu penyakit. Menurut Song Yu *et al* (2004), tingginya indeks apoptosis pada sel granulosa folikel menunjukkan bahwa folikel tersebut mengalami atresia.



Menurut peneliti, peningkatan indeks apoptosis pada sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier dapat terjadi karena organ ovarium hewan coba mendapat paparan sipermetrin setiap hari selama 28 hari sehingga terjadi akumulasi radikal bebas di ovarium. Enzim antioksidan dalam ovarium tidak mampu menangkap radikal bebas yang terlalu banyak dan akhirnya terjadi apoptosis yang tinggi pada sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier.

Pada folikel primer, jumlah sel granulosa nya meningkat sedangkan indeks apoptosisnya juga meningkat. Hal ini diduga karena proses apoptosis pada sel granulosa folikel primer masih terjadi pada tahap awal dimana apoptosis telah terjadi, namun makrofag belum memakan sel yang mati tersebut, sehingga pada pemeriksaan *haematoxilen eosin* tampak jumlah sel granulosa meningkat namun indeks apoptosis juga meningkat.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian teoritik diatas, maka paparan sipermetrin dosis rendah per oral terbukti meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa pada folikel primer, sekunder dan tersier.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah peneliti tidak melakukan pemeriksaan ROS dalam ovarium, sehingga tidak bisa membuktikan paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap peningkatan stress oksidatif di ovarium. Selain itu, peneliti juga tidak melakukan pemeriksaan kadar FSH, sehingga tidak dapat membuktikan paparan sipermetrin dosis rendah per oral terhadap penurunan kadar FSH.



BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 SIMPULAN

- a. Paparan sipermetrin dosis rendah per oral tidak terbukti dalam menurunkan jumlah sel granulosa folikel primer per lapang pandang.
- b. Paparan sipermetrin dosis rendah per oral terbukti secara signifikan dapat menurunkan jumlah sel granulosa folikel sekunder dan tersier per lapang pandang.
- c. Paparan sipermetrin dosis rendah per oral terbukti secara signifikan dapat meningkatkan indeks apoptosis sel granulosa folikel primer, sekunder dan tersier.

7.2 SARAN

- a. Penelitian dapat dilanjutkan dengan pemberian perlakuan teraupetik untuk mengurangi efek toksik sipermetrin.
- b. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan pemberian paparan sipermetrin dengan konsentrasi emulsi sipermetrin lebih rendah dengan jangka waktu lebih lama.
- c. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan meneliti pemberian sipermetrin per oral terhadap kadar FSH.
- d. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian paparan sipermetrin per oral terhadap organ non reproduksi.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S. dan Rezaie A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review, *Med. Sci. Monit.* **10** (6) : 141-147.
- Agha, Abdulmoein., Alash, Duaa dan Tatwany, Bara'ah., 2015. The Relationship between Xenoestrogen Exposure and Early Puberty among Young Female Living in Jeddah, Saudi Arabia. *Family Medicine and Medical Science Research.* **4** (04) : 1-4.
- ATSDR, 2003. Toxicological Profile For Pyrethrins Pyrethroid [Online]. Atlanta. ATSDR: US Departement Of Health and Human Services. *Available from:* www.atsdr.cdc.gov. Diunduh tanggal 13/03/2017.
- Baerwald, AR., Adam, GP dan Pierson, RA. 2012. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update.* **18** : 73-91.
- Becker, Kenneth. 2001. *Principles and Practice Of Endocrinology and Metabolism*, 3rd edition. Lippincott Williams and Wilkins: USA
- Berki, Timea., Boldiszar, Ferenc., Szabo, Mariann., Talaber, Gergo., Varcza, Zoltan., 2011. Signal Transduction (Medical Biotechnology), Hungaria. *Available from* http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book. Diunduh tanggal 31/03/2017.
- Bhardwaj, Subbash dan Wani, Farooq. 2015. Evaluating the importance of apoptotic index, mitotic index, and turnover index in premalignant and malignant lesions of cervix. *Scientific Research Publishing.* **5**: 29 – 37.
- Boron, W.F dan Boulpaep, E.L., 2012. *Medical Physiology*. 2nd edition. Saunders: Philadelphia.
- BPOM, 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 7 tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara *in vivo*. BPOM. *Available from:* www.jdi.h.pom.go.id. Diunduh tanggal 12/02/2017.
- BPC, 2013. Regulation (EU) number 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal (Cypermethrin). *Available from:* <https://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation>. Diunduh tanggal 19/04/2017.
- Brander, S., Connon, R., Fowler, N. dan Schlenk, D., 2016. Phyretroid Pesticide as Endocrine Disruptors: Moleculer Mechanisms in vertebrates With Focus On Fishes, *Enviromental Science And Technology.* **50** (17) : 8977-8992.
- Bretveld, R.W., Thomas, C.M.G., Scheepers, P.T.J., Zielhuis, G.A. dan Roeleveld, N., 2006. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted, *Reproductive Biology and Endocrinology.* **4** (30) : p. 30-40.



BSN, 2008. Keputusan Kepala Badan Standarisasi Nasional Nomor 57/Kep/BSN/2008 tentang Batas Maksium Pesticida Pada Hasil Pertanian. BSN. Available from: www.sisni.bsn.go.id. Diunduh tanggal 03/03/2017.

Budiarto E. 2004. *Metodologi Penelitian Kedokteran*. 1st edition. EGC. Jakarta.

Cheon, Yong. 2012. Regulation and 3 dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clin Exp Reprod Med*. **39** (3) : p. 95-106.

Conti, M. dan Chang, J. 2010. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. 7th edition. Elsevier, Philadelphia.

Coad, Jane dan Dunstall, Melvyn. 2011. *Anatomy and Physiology For Midwife*. 3rd edition. Elsevier. British.

Comack, David. 2001. *Esential Histology*, 2nd edition. Lippincott William and Wilkins. USA.

Cote, Jonathan., Bonvalot, Yvette., Carrier, Gaetan., Lapointe, Caroline., Fuhr, Uwe., Tomalik, Dorota., Wachall, Bertil., Bouchard, Michele. 2014. A Novel Toxicokinetic Modeling of Cypermethrin and Permethrin and Their Metabolites in Humans for Dose Reconstruction from Biomarker Data. *Plos One*. **9** (02) : 1:17.

Cuiling, Lu. Yang, Wei, Zhaoyuan Hu dan Yixun, Liu. 2005. Granulosa Cell Proliferation Differentiation and its role in Follicular Development. *Chinese Science Bulletin*. **50** (23) : 2665-2671.

Crisp, T.M., Clegg, E.D, Cooper, R.L., Wood, W.P., Anderson, D.G., Baetcke K.P., Hoffman J.L., Morrow M.S, Rodier D.J., Schaeffer, J.E., Touart, Zeeman dan Patel. 1998. Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assesment Analysis. *Enviromental Health Perspective*. P. 11-56.

Dahlan, S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan kesehatan*. 3rd edition. Salemba Medika. Jakarta.

Dahari, Nitzan., Hainemann, Lia Yerushalmi., Alyagir, Liat., Dekel, Nava., 2016. Ovarian Folliculogenesis. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27300179>. Diunduh tanggal 14/04/2017.

Devine, P.J., Perrault, SD., Luderer, U., 2012. Role Of Reactive Oxygen Species And Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biology Reproduction*. **86** (02) : p.1-10.

Djojosumarto, Panut. 2008. *Panduan Lengkap Pesticida dan Aplikasinya*. 1st edition. Agromedia Pustaka. Jakarta: p 1-100.

Duru, K., Morshedi., Oehninger, S. 2000. Effect of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil steril*. **74** (06) : 1200 – 7

Elmore, Susan. 2007. A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*. **35** (04): 495-516.



EPA, 2006. Reregistration Eligibility Decision for Cypermethrin dalam EPA-HQ-OPP-2005-0293-0036. US Environmental Protection Agency. Available from <https://archive.epa.gov/pesticides>. Diunduh tanggal 02/02/2017.

Erickson, Gregory. 2008. Follicle Growth And Development. Available from https://www.glowm.com/section_view/heading/Follicle_Growth_and_Development. Diunduh tanggal 08/02/2017.

Elbetieha, A., Da'as S.I., Khamas, W dan Darmani, H. 2001. Evaluation of The Toxic Potentials of Cypermethrin Pesticide on Some Reproductive and Fertility Parameters in the Male Rats. *Arch Environment Contam. Toxicol.* **41** (4) : 522-528.

Eraslan, G., Kanbur, M., Silik, Y., M. Karabacak., Sarica, Soyer., dan Sahin, S. 2016. The acute and Chronic Effect of Cypermethrin, Propetamphos, and Their Combination in Rats, *Environmental Toxicology.* **31** (11) : 1415-1429.

Eroschenko, Victor. 2008. *diFiore's Atlas of Histology With Functional Correlations*. 11th edition. Lippincott Williams dan Wilkins. USA.

Evan, R.C., Diplock, A. dan Symons, M. 1991. *Laboratory Technique In Biochemistry and Molecular Biology*. 1st edition. Elsevier Science Publisher. New York.

Gabbianelli, R., Nastuti., Falcioni., Cantalamessa, F., 2004. Lymphocyte DNA Damage in Rats Exposed to Pyrethroid Effect of Supplementation with Vitamin E. *Journal Of Toxicology.* **203** : 17-26.

Gougeon, A. 2010. Human Ovarian Follicular Development: From Activation of Resting Follicle to Preovulatory Maturation. *Ann Endocrinol.* **71** (03): 132-43.

Gold, Jay., Josimovich, John. 2011. *Gynaecology endocrinology*. 4th edition. Plenum Medical Book Company. New York.

Ghumman, Surveen. 2015. *Principle and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART*. Springer. India.

Grewal, K., Sandu, S., Kaur, Ranjit., Braur, S., 2010. Toxic Impacts of Cypermethrin on Behavior and Histology of certain Tissues of Albino Rats. *Toxicology International.* **17** (02): 94:98.

Hadi, Restu Samsul. 2011. Mekanisme Apoptosis Pada Regresi Sel Luteal, *Pharma Medika.* **3** (01): 246-254.

Hayes, W., Thomas, J dan Gardner, D., 2004. *Ovarian Toxicology*. 2nd edition. CRC Press. Florida.

Hanafiah, A.K. 2014. *Rancangan dan percobaan (Teori dan Aplikasi)*. 3rd edition. Rajawali Press. Palembang.

Hanrahan, JP., Gregan, SM., Mulsant *et al.* 2004. Mutations in the Genes For oocyte-derived growth factor GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and belclare sheep. *Biology of reproduction.* **70** : 900-909.



- Hamdani, Nada dan Yaiurvedi, H.N., 2017. Effect of cypermethrin on the ovarian activity and its impact on fertility and pubertal onset of offspring. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science*. P 1-9.
- Heffner, L.J., dan Schust, D.J., 2010. *At a Glance Sistem Reproduksi*. 2nd edition. Erlangga. Jakarta.
- Henary, Shannon., George, Thaddeus dan Hall, Brian., 2008. Quantitative image based apoptotic index measured using multispectral imaging flowcytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*. **13** (08): 1054
- Hill, M., 2017. Embryology, New South Wales. Available from <https://embryology.med.unsw.edu.au>. Diunduh tanggal 15/02/2017.
- Hill, MM., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J., 2004. Analysis of the Composition, Assembly Kinetics and Activity of Native Apaf-1 apoptosome. *Embo Journal*. **23** (10): 2135-2145.
- Hudayya, Abdi dan Jayanti, Hadis. 2012. *Pengelompokan Pestisida Berdasarkan Cara Kerjanya (Mode Of Action)*. 1st edition. Yayasan Bina Tani Sejahtera. Bandung. p 7- 30.
- Huang, F., Liu, Q., Xie S., Xu J., Huang B., Wu Y., et al., 2016. Cypermethrin Induce Macrophages Death Through Cell Cycle Arrest And Oxidative Stress Mediated JNK/ERK signalling Regulated Apoptosis, *International Journal of Molecular Science*. **17** (885): 1-13.
- Hussain, S., Khan, MZ., Khan, A., Javed, I., dan Asl, MR., 2009. Toxicopathological effects in rats induced by concurrent exposure to aflatoxin and cypermethrin. *Toxicol*. **52** : 33-41.
- Hussien, H., Abdou, H. dan Yousef, M., 2011. Cypermethrin induce Damage in Genomic DNA and Histopathological Change In Brain And Hematotoxicity In Rats : The Protective Effect Of Sesame Oil, *Brain Research Bulletin*. **92**: 76-83.
- Hunzicker, Dunn., Maizels, E.T., 2006. FSH Signaling Pathway in Immature Granulosa Cell That Regulate Target Gene Expression: Branching Out From Protein Kinase. *Cell Signal*. **18** (09) : 1351-1359.
- Hutt, Kalra. 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*. **14** (6) : 758-764.
- Idris, S., Ambali, S., Ayo, J., 2012. Cytotoxicity of Chlorpyrifos and cypermethrin : The ameliorative effects of antioxidants. *African Journal of Biotechnology*. **11** (99) : 16461:16467.
- Ince, Sinan., Kucukkurt, Ismail., Demirel, Hasan., Turkmen, Ruhi., Sever, Emine., 2012. Thimoquinone attenuates cypermethrin induce oxidative stress in Swiss albino mice. *Pesticide Biochemistry And Physiology*. **104** (2012): 229-235.
- Jacoby R., Fox J.G. dan Davisson M. 2002, *Laboratory Animal Medicine*. 2nd editon. Academic press. USA.



Jameson, Larry and Groot, Leslie. 2010. *Endocrinology*. 6th edition. Elsevier: Philadelphia.

Karlinah, Nelli., Yanti, Efrida dan Arma, Nuriah. 2015. *Bahan Ajar Embriologi Manusia*. 1st edition. Deepublish Publisher. Yogyakarta.

Kalra, Shasta., Sangha, Gurinder., 2016. Evaluation of oxidative stress and reproductive potential in female *Rattus Rattus*, *Bandicota Bengalensis* and *Tatera Indica* Rats. *International Journal of Advanced Research*. **4** (09): 940-947.

Kementan, 2015. Permentan RI nomor 04/Permentan/PP.340/2/2015 tentang Pengawasan Keamanan Pangan Terhadap Pemasukan dan Pengeluaran Pangan Segar Asal Tumbuhan. Kementerian Pertanian. Available from www.perundangan.pertanian.go.id. Diunduh tanggal 13/03/2017.

Kotil, T., dan Yon, Ni., 2015. The effects of permethrin on rat ovarian tissue morphology, *Experimental and Toxicologic Pathology*. **67**(3): 279-285.

Koolhas, J. 2010. *The Laboratory Rat in The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8th edition. Wiley Blackwell. Oxford.

Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. 1st Edition. Gadjah Mada university Press. Yogyakarta.

Kimia, S.K., 2015. *Daftar Produk Insektisida*. Available from www.kresna.co.id/sari_kresna_kimia. Diunduh tanggal 21/03/2017.

Kramer. 2000. CD95 deadly mission in the immune system. *Nature*. **407** (6805): 789-795.

Krishna, Abhilasha. 2000. Proliferative activity of follicles and serum steroid concentration in *Scotophilus heathi* during periods of delayed ovulation. *Can J. Zool*. **78** (8) : 1301: 1308.

Lakkawar, Chattopadhyay dan Somuanshi. 2004. Experimental cypermethrin toxicity in rabbits- a clinical and patho-anatomical study. *Folia Veterinaria*. **48** : 3-8.

Levy, Mathew., Stanton, Bruce dan Koeppen, Bruce., 2006. *Principle Of Physiology*. 4th edition. Elsevier. Philadelphia.

Li H., Cheng F., Wei Y., Lidy M.J. dan You J., 2016. Global Occurence Of Pyrethroid Insecticides In Sediment And The Association Toxicological Effects On Benthic Invertebrates : An Overview, *Journal Of Hazardous Material*. **324** (2017): 258-271.

Linawati, Lidya. Studi Keamanan Pangan Sayur Lalapan [skripsi]. Malang. Universitas Brawijaya: 2011.

Lumongga, Fitriani. 2008. *Apoptosis*. Medan. Available from <http://www.repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/2061/1/09EO1457> tanggal 21/02/2017.

Loekman, V., Suyani, H., Munaf E. dan R Z. 2005. Penentuan Sipermetrin dan Permetrin sebagai Residu Pestisida dalam Kubis secara HPLC, *Jurnal Kimia Andalas*. **11** (1): 21 – 24.



- Loo, Deryck. 2010. In situ Detection of Apoptosis by the TUNEL Assay: An Overview of Techniques. *Methods in Molecular Biology*. p. 3-13.
- Look, Paul F.A., Heggenhougen, H.K dan Quah, Stella R., 2011. *Reproductive Health: A public Health Perspective*. Academic Press, British.
- Manna, S., Bhattacharyya, D., Mandal, TK., Das, S. 2004. Repeated Dose Toxicity of Alfa-Cypermethrin in Rats. *Journal Veterinary Sci technology*. **5** (03) : 241-245.
- Manuaba, I.B.G., Manuaba, Chandranita I.A, dan Manuaba, Fajar I.B.G., 2007. *Pengantar Kuliah Obstetri*. 1st edition. EGC. Jakarta. p. 63-78.
- Martin, R.L., Pittendrigh, B., Liu, Reenan, R, French, Constan., Hanck, D.A., 2000. Point Mutation in Domain III of a Drosophila Neural Na Channel Confer Resistance to Allethrin. *Insect Biochemical Molecular Biology*. **30**: 1051-1059.
- Marieb E. 2011. *Essential Of Anatomy And Physiology* 9th edition. Pearson education, London.
- McCarthy, Anna., Thomson, Barbara., Shaw, Ian, Abel, Andrew., 2005. Estrogenicity of Pyrethroid Insecticide Metabolite. *Journal Of Enviromental Monitoring*. **8** : 197-202.
- McQueen, Charlene. 2010. *Comprehensive Toxicology*. 2nd edition. Elsevier. United Kingdom.
- Melmed, Shlomo., Polonsky, Kenneth dan Larsen, Reed. 2016. *Williams Textbook of Endocrinology*. 13th edition. Elsevier, Philadelphia.
- Minehata, Matsuda Fuko., Inoue, Naoko., Goto, Yasufumi., Manabe, Noboru., 2006. The Regulation Of Ovarian Granulosa Cell Death By Pro and Anti Apoptotic Molecules. *Journal Of Reproduction And Development*. **52** (06) : 695-705.
- Mutiatikum, D., Murad, J. dan Endreswari, S., 2003. Profil Residu Pestisida Ditiokarbamat Dalam Tomat dan Selada Pada Tingkat Konsumen di DKI Jakarta. *Media Litbang Kesehatan*. **13**(4) : 1-5.
- Mossa, A.T.H., Heikal, T.M., Belaiba, M., Raelison, E.G., Ferhout, H. dan Bouajila, J., 2015. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Cedrelopsis grevei on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **15**:251.
- Molavi M., Razi M., Malekinejad H., Amniattalab A. dan Rezaie H., 2014. Vitamin E improved cypermethrin induced damage in the ovary rats; Evidence for angiogenesis and p53 involvement, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **110** (2014) : 27 - 35.
- Morita, Yutaka dan Trilly, Jonathan. 1999. Oocyte apoptosis: Like Sand Through An Hourglass, *Developmental biology*. **213**: 1-17.
- Nagarjuna, A dan Doss, Jacob., 2009. Accute Oral Toxicity and Hithopathological Studies Of Cypermethrin In Rats. *Indian Journal Animal Research*. **43** (4) : 235-240.
- Niquet, J., Baldwin, R.A., Allen, S.G., Fujikawa, D. dan Wasterlain, C.G., 2003. Hypoxic neuronal necrosis: protein synthesis independent activation of a cell death program. *Proceeding National Academy Science*. **100** (5): 2825-2830.



- Nursinah, Amir. Keamanan Pangan Produk Ikan Jambal Roti Manyung [Disertasi]. Malang: Universitas Brawijaya, 2014.
- Orisaka, Makkoto., Tajima, Kimihisa., Tsang, Benjamin and Kotsuji, Fumikazu. 2009. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal Of Ovarian Research*. **2** (9). 1:7.
- Osthoff dan Schulze, K. 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell proliferation*. 4th edition. Roche. Germany. p.1-14.
- Pavlik, R., Wypior, G., Hecht, S., Papadopoulos, P., Kupka, M., Thaler, C., *et al.*, 2011. Induction of G Protein – Coupled Estrogen Receptor and Nuclear Steroid Hormone Receptors by Gonadotrophins in Human Granulosa Cells. *Histochemistry and Cell Biology*. **136** (3): 289-299.
- Panghiyangani, R., Soeharso, P., Suryandari. 2013. Indeks proliferasi sel granulosa ovarium pada wanita Spok yang mengikuti program bayi tabung. *Seminar nasional ke-22 Perhimpunan Biologi Indonesia*.
- Pelletier, G dan El-Alfy., 2000. Immunocytochemical Localization of Estrogen Receptor. *The Journal of Endocrinology and Metabolism*. **85** (12) : 4835:4840.
- POGI H., PERFITRI. IAUI. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas Jakarta*. Available from www.pogi.or.id. Diunduh tanggal 17/03/2017.
- Ray, P.D., Huang, B.W. dan Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*. **24**(5): 981-990.
- Renehan, Andrew., Booth, Catherine., Pooten, Christopher., 2001. What is apoptosis and why is it important?. *British Medical Journal*. **322** : 1536-1538.
- Risna A. Survei Indikasi Infertilitas Pada Perempuan Usia Subur Yang Terpajan Pestisida [Skripsi]: Universitas Muhammadiyah Semarang, 2016.
- Sangha, G., Kamalpreet, K. dan Khera K., 2012. Cypermethrin Induced Pathological and Biochemical Changes in Reproductive Organs of Female Rats, *Journal Of Enviromental Biology*. **34**: 99-105.
- Saelans, X., Festjens, N., Vande, Walle., Van Gorp, M., Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins release from mitochondria in cell death. *Oncogene*. **23**: 2861-74.
- Sakung, J. 2004. Kadar Residu Pestisida Golongan Organofosfat Pada Beberapa Jenis Sayuran, *Jurnal Ilmiah Santina*. **(1)**: 520 – 525.
- Sankar, Palanisamy., Telang, Avinash., Manimaran, Ayyasamy. 2011. Effect Of Piperine On Cypermethrin induced Oxidative Damage in Rats. *Journal Veterinar Sci technology*. **2** (01): 1-5.
- Sayim, Ferah., Karabay, Nefise Yavasoglu., Uyangkgil, Yigit., Aktug, Huseyin., Yavasoglu, Altug., dan Turgut, Mehmet. 2005. Neurotoxic effects of cypermethrin on wistar rats: a haematological, biochemical and histopathological study. *Journal of Health Science*. **51** (3): 300-307.



- Sengupta P., 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's, *Int J Prev Med.* 4(6): 624-630.
- Sharma, R.K dan Bhardwaj, J.K., 2012. Apoptosis and Ovarian Follicular Atresia in Mammal. Available from : http://www.intechopen.com/books/zoology/apoptosis_and_ovarian_follicular_atresia_in_mammals. Diunduh tanggal 10/03/2017.
- Singh, A.K., Tiwari, M.N., Prakash, O. dan Singh, M.P., 2012. A Current Review of Cypermethrin-Induced Neurotoxicity and Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration, *Curr Neuropharmacol.* 10(1): 64-71.
- Sinha, K., Das, J., Pal, dan Sil. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology.* 87(7) : 1157-1180
- Song Yu, Yuan., Shu Shui, Hong., Bin Han, Zheng., Li, Wei., Jiu Luo, Ming., He Tan, Jing., 2004. Apoptosis in Granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors, *Cell Research.* 14(4) : 341-346.
- Sowash, J. 2009. *Rat Dissection.* Available from <http://jrsowash.wikispaces.com/file/view/>. Diunduh tanggal 10/02/2017.
- Souza, A.d., Medeiros A.d.R., Souza, A.C.d., Wink M., Siqueira, I.R., Ferreira M.B.C., et al., 2011. Evaluation of The Impact of Exposure to Pesticides on The Health of The Rural Population: Vale do Taquari. *Ciencia and Saude Coolectiva.* 16: 519-3528.
- Strauss, Jerome dan Berbiery, Robert. 2013. *Yen and Jeff's Reproductive endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management.* 7nd edition. Elsevier Saunders.
- Suckow, M., Weibroth, S. dan Franklin, C. 2006. *The Laboratory Rat.* 2nd edition. American College Of Laboratory, USA.
- Sudiana, I ketut. 2008. *Patobiologi Molekular Kanker.* 2nd edition. Salemba Medika. Jakarta. p: 45 – 46.
- Swarjana, I.K. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan.* 1st edition, Andi Offset. Yogyakarta.
- Tebourbi, Olfa., Sakly, Mohsen., Sakly dan Rhouma, Khemais. 2011. Molecular Mechanisms of Pesticide Toxicity, pesticides in The Modern World. Available from www.inthechopen.com/books/pesticides_in_the_modern_world_pests_control_and_pesticides_exposure_and_toxicity_assesment/molecular_mechanisme_of_pesticide_toxicity. Diunduh tanggal 12/03/2017.
- Tesone, Marta., Abramovich, Dalhia., Iruستا, Griselda., Parborrel, Fernanda. Autocrine and Paracrine Regulation of The Ovary. In: Chederese, Jorge, editor. *Reproductive Endocrinology : A Molecular Approach.* Canada: Springer; 2009. p. 241-242.
- Townson, D.H. dan Combelles, C.M. 2012. *Ovarian Follicular Atresia-Basic Gynaecology.* In Tech, Europe. Available from <https://www.glowm.com/pdf/Book-InTech-Basic-Gynecology>. Diunduh tanggal 15/03/2017.



- Turrens. 2003. Mitochondrial Formation of reactive Oxygen Species. *The Journal of Physiology* **552** (02) : 335-344.
- Van Cruchten, S. dan Van den Broeck, W., 2002. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. **31**(4): 214-223.
- Vinggard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V dan Larsen, J.C. 2000. Screening of Selected Pesticide For Inhibition of CYP19 Aromase Activity in Vitro. **14**: 227 - 234.
- Vazquez, Gerardo., Escobar, Maria., De Felici, Massimo., Echverria, Olga., Klinger, Francesca. 2011. *Cell Death in Mammalian Ovary*. Springer. Available from www.springer.com/in/book/978940071133. Diunduh tanggal 14/04/2017.
- Wakeling, Erin., Neal, April., dan Atchinson, William. Pyrethroids and their effects on ion channel. In *Pesticides - advances in chemical and botanical pesticides*. Intech; 2012. p. 39-58.
- Wielgomas, B. dan Krechniak, J., 2007. Effect of alpha cypermethrin and Chlorpyrifos in a 28 Day Study On Free Radicals Parameters and Cholinesterase Activity in Wistar Rats, *Polish Journal Of Enviromental Studies*. **16**(1): 91 - 95.
- WHO. 2006. Cypermethrin (Including Alpha and Zeta Cypermethrin). Geneva ; World Health Organization. Available from www.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Document/129. Diunduh tanggal 12/02/2017.
- Wu, Z., Chen, S., Pan, H., Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Activation down-regulation Voltage-Gated Calcium Channel through Calcium Dependent Calcineurin in Sensory Neuron. 2005. *J Biol Chem*. **280**: 18142-1851.
- Zeiss, CJ., 2003. Apoptosis-Necrosis Continuum Insight From Genetically Altered Mice, *Veterinary Pathology* **40**. 481-495.



Lampiran 1 Surat Keterangan Laik Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755

http://www.fk.ub.ac.id

e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 222 / EC / KEPK – S2 / 06 / 2017

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

JUDUL : Pengaruh Paparan Sipermetrin Peroral terhadap Ekspresi Bcl-2 Sel Granulosa Ovarium, Jumlah Folikel Antral, Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier, Jumlah Sel Granulosa Per Lapang Pandang, Indeks Apoptosis Endometrium, Ketebalan Endometrium, Kadar 17B-Ekstradiol Serum dan Malondialdehide (MDA) Uterus pada Tikus Betina Galur Wistar (*Rattus norvegicus*).

PENELITI UTAMA : Indrayanti
Novita Eka Kusuma Wardani
Respatiningrum
Hesty Widowati

UNIT / LEMBAGA : S2 Kebidanan - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Catatan :

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



Lampiran 2 Surat Keterangan Turnitin



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
BADAN PENERBITAN JURNAL
 Jalan Veteran Malang-65145, Jawa Timur – Indonesia
 Telp.(0341) 551611 Pes. 110 : 569117, 567192 – Fax.(62) (0341) 564755
 e-mail : bpjkedokteran@gmail.com

SURAT KETERANGAN
 Nomor : 147/UN10.7/BPJ/VII/2017

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul : Pengaruh Paparan Sipermetrin Dosis Rendah Per Oral Terhadap Indeks Apoptosis dan Jumlah Sel Granulosa Per Lapang Pandang pada Folikel Tersier Tikus Galur Wistar

Penulis : Novita Eka Kusuma Wardani

NIM : 156070400111009

Jumlah Halaman : 91

Jenis Artikel : Tesis

Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 31 Juli 2017
 Ketua Badan Penerbitan Jurnal FKUB

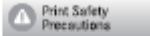


Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
 NIP 19751125 200501 2 001



Lampiran 3 Katalog In Situ Apoptosis Detection Kit

For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.



In Situ Cell Death Detection Kit, POD

Version 14

Content version: July 2012

Kit for immunohistochemical detection and quantification of apoptosis (programmed cell death) at single cell level, based on labeling of DNA strand breaks (TUNEL technology): Analysis by light microscopy.

Cat. No. 11 684 817 910

1 Kit (50 tests)

Store the kit at -15 to -25°C

www.roche-applied-science.com



Lampiran 4 Berat Badan Tikus Sebelum dan Selama Perlakuan

Tabel Berat Badan Tikus Sebelum dan Selama Perlakuan

| Kelompok Perlakuan | No. Tikus | Berat badan Sebelum Perlakuan BB awal (gr) | Berat badan saat perlakuan | | | | |
|-----------------------|--------------|---|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | BB (gr) | BB (gr) | BB (gr) | BB (gr) | BB (gr) |
| | | | Minggu 0 | Minggu 1 | Minggu 2 | Minggu 3 | Minggu 4 |
| Kontrol | 1 | 121.32 | 114.53 | 147.42 | 152.55 | 155.52 | 159.77 |
| | 2 | 122.91 | 110.32 | 118.56 | 128.87 | 145.45 | 154.37 |
| | 3 | 124.71 | 120.4 | 176.72 | 174.23 | 168.72 | 175.19 |
| | 4 | 117.6 | 124.71 | 144.9 | 155.78 | 170.54 | 173.1 |
| | 5 | 114.53 | 178.64 | 126.74 | 145.8 | 175.55 | 189.61 |
| | 6 | 120.4 | 171.62 | 167.21 | 173.88 | 180.77 | 168.95 |
| I | 1 | 133.32 | 133.32 | 158.67 | 160.83 | 169.29 | 157.9 |
| | 2 | 137.2 | 134.91 | 163.17 | 168.01 | 181.02 | 162.36 |
| | 3 | 139.75 | 130.35 | 141.96 | 147.26 | 144.93 | 141.12 |
| | 4 | 142.79 | 137.2 | 144.52 | 149.19 | 158.34 | 150.67 |
| | 5 | 158.84 | 132.72 | 150.01 | 144.1 | 159.16 | 148.69 |
| | 6 | 134.42 | 121.32 | 122.84 | 126.95 | 128.84 | 123.37 |
| II | 1 | 138.95 | 134.42 | 145.72 | 143.59 | 157.03 | 147.97 |
| | 2 | 136.9 | 126.58 | 130.83 | 129.44 | 153.28 | 141.22 |
| | 3 | 140.85 | 133.67 | 150.47 | 143.17 | 158.02 | 145.21 |
| | 4 | 132.72 | 124.15 | 136.2 | 132.24 | 153.85 | 149.88 |
| | 5 | 137.04 | 136.9 | 147.25 | 140.61 | 149.49 | 148.12 |
| | 6 | 124.15 | 137.04 | 151.28 | 149.6 | 164.89 | 152.91 |
| III | 1 | 128.29 | 147.15 | 166.68 | 188.71 | 189.85 | 163.97 |
| | 2 | 126.58 | 119.53 | 139.61 | 157.2 | 145.71 | 134.47 |
| | 3 | 133.67 | 142.79 | 154.17 | 142.51 | 181.65 | 172.55 |
| | 4 | 120.53 | 107.8 | 123.79 | 119.48 | 136.63 | 133.57 |
| | 5 | 130.35 | 141.3 | 176.9 | 168.71 | 163.1 | 154.72 |
| | 6 | 119.53 | 138.95 | 155.78 | 133.82 | 160.61 | 155.19 |

Lampiran 5 Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

Tabel Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer Per Lapang Pandang | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | LP 1 | LP 2 | LP 3 | LP 4 | LP 5 | LP 6 | LP 7 | LP 8 | LP 9 | LP 10 |
| Kontrol | 1 | 73 | 88 | 85 | 76 | 93 | 93 | 77 | 90 | 75 | 89 |
| | 2 | 74 | 56 | 76 | 88 | 90 | 94 | 90 | 91 | 87 | 89 |
| | 3 | 70 | 73 | 83 | 83 | 76 | 86 | 89 | 98 | 76 | 87 |
| | 4 | 80 | 85 | 92 | 87 | 79 | 81 | 82 | 83 | 89 | 92 |
| | 5 | 84 | 45 | 76 | 81 | 65 | 80 | 85 | 90 | 92 | 94 |
| | 6 | 90 | 99 | 78 | 90 | 92 | 78 | 81 | 86 | 88 | 90 |
| Perlakuan I | 1 | 97 | 63 | 100 | 101 | 108 | 106 | 98 | 105 | 121 | 94 |
| | 2 | 93 | 90 | 88 | 97 | 98 | 100 | 99 | 100 | 96 | 90 |
| | 3 | 94 | 92 | 100 | 85 | 99 | 108 | 101 | 98 | 103 | 99 |
| | 4 | 97 | 95 | 97 | 88 | 90 | 102 | 97 | 96 | 104 | 102 |
| | 5 | 90 | 96 | 93 | 98 | 121 | 116 | 98 | 95 | 105 | 92 |
| | 6 | 93 | 95 | 97 | 100 | 111 | 100 | 92 | 105 | 95 | 90 |
| Perlakuan II | 1 | 133 | 145 | 116 | 100 | 146 | 146 | 153 | 143 | 124 | 120 |
| | 2 | 115 | 155 | 127 | 132 | 147 | 125 | 126 | 147 | 136 | 145 |
| | 3 | 116 | 127 | 134 | 143 | 143 | 143 | 145 | 114 | 142 | 137 |
| | 4 | 135 | 147 | 129 | 126 | 136 | 125 | 138 | 145 | 143 | 139 |
| | 5 | 125 | 118 | 139 | 136 | 146 | 132 | 132 | 124 | 149 | 112 |
| | 6 | 136 | 127 | 124 | 134 | 143 | 143 | 143 | 154 | 136 | 137 |
| Perlakuan III | 1 | 173 | 160 | 153 | 153 | 163 | 158 | 154 | 156 | 153 | 149 |
| | 2 | 163 | 154 | 132 | 158 | 143 | 163 | 148 | 163 | 165 | 157 |
| | 3 | 153 | 168 | 165 | 149 | 148 | 142 | 143 | 100 | 122 | 111 |
| | 4 | 147 | 158 | 157 | 162 | 127 | 158 | 147 | 144 | 129 | 165 |
| | 5 | 158 | 159 | 162 | 150 | 143 | 142 | 151 | 134 | 126 | 130 |
| | 6 | 142 | 159 | 149 | 149 | 153 | 138 | 172 | 133 | 185 | 165 |



Lampiran 6 Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

Tabel Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder Per Lapangan Pandang | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | LP 1 | LP 2 | LP 3 | LP 4 | LP 5 | LP 6 | LP 7 | LP 8 | LP 9 | LP 10 |
| Kontrol | 1 | 255 | 312 | 267 | 261 | 222 | 298 | 266 | 311 | 196 | 300 |
| | 2 | 234 | 257 | 312 | 300 | 321 | 319 | 322 | 341 | 346 | 300 |
| | 3 | 265 | 271 | 274 | 269 | 270 | 256 | 243 | 259 | 287 | 299 |
| | 4 | 216 | 311 | 289 | 300 | 312 | 219 | 309 | 312 | 319 | 322 |
| | 5 | 231 | 311 | 322 | 311 | 347 | 312 | 321 | 312 | 320 | 299 |
| | 6 | 220 | 322 | 298 | 323 | 298 | 315 | 286 | 264 | 277 | 215 |
| Perlakuan I | 1 | 244 | 261 | 262 | 243 | 275 | 219 | 217 | 286 | 219 | 245 |
| | 2 | 265 | 254 | 245 | 224 | 265 | 237 | 285 | 265 | 277 | 251 |
| | 3 | 105 | 200 | 265 | 240 | 221 | 286 | 254 | 259 | 278 | 287 |
| | 4 | 255 | 241 | 283 | 229 | 198 | 252 | 240 | 300 | 266 | 255 |
| | 5 | 212 | 215 | 243 | 255 | 276 | 269 | 279 | 256 | 264 | 285 |
| | 6 | 231 | 230 | 226 | 251 | 266 | 222 | 266 | 231 | 215 | 209 |
| Perlakuan II | 1 | 200 | 207 | 223 | 211 | 155 | 214 | 226 | 204 | 241 | 102 |
| | 2 | 200 | 195 | 243 | 224 | 244 | 201 | 206 | 241 | 225 | 199 |
| | 3 | 231 | 198 | 205 | 199 | 231 | 243 | 245 | 227 | 227 | 256 |
| | 4 | 197 | 200 | 222 | 198 | 241 | 265 | 217 | 220 | 216 | 186 |
| | 5 | 192 | 215 | 237 | 204 | 226 | 204 | 257 | 231 | 214 | 197 |
| | 6 | 220 | 233 | 229 | 243 | 214 | 184 | 254 | 205 | 209 | 223 |
| Perlakuan III | 1 | 186 | 197 | 152 | 154 | 196 | 154 | 142 | 139 | 156 | 167 |
| | 2 | 163 | 186 | 133 | 149 | 120 | 199 | 164 | 124 | 149 | 197 |
| | 3 | 197 | 200 | 157 | 132 | 197 | 200 | 209 | 216 | 220 | 189 |
| | 4 | 169 | 187 | 120 | 146 | 189 | 133 | 146 | 122 | 172 | 157 |
| | 5 | 190 | 201 | 182 | 152 | 149 | 163 | 132 | 144 | 182 | 154 |
| | 6 | 187 | 186 | 179 | 180 | 200 | 196 | 199 | 199 | 187 | 148 |



Lampiran 7 Hasil Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

Tabel Penghitungan Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier Per Lapang Pandang | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | | LP 1 | LP 2 | LP 3 | LP 4 | LP 5 | LP 6 | LP 7 | LP 8 | LP 9 | LP 10 |
| Kontrol | 1 | 252 | 312 | 287 | 261 | 246 | 280 | 236 | 286 | 242 | 329 |
| | 2 | 365 | 345 | 326 | 312 | 321 | 319 | 323 | 352 | 348 | 325 |
| | 3 | 255 | 287 | 283 | 275 | 287 | 276 | 249 | 249 | 287 | 295 |
| | 4 | 367 | 311 | 289 | 299 | 312 | 341 | 309 | 312 | 347 | 361 |
| | 5 | 289 | 311 | 354 | 311 | 354 | 312 | 321 | 312 | 320 | 309 |
| | 6 | 372 | 340 | 312 | 323 | 332 | 317 | 301 | 312 | 320 | 304 |
| Perlakuan I | 1 | 256 | 274 | 262 | 243 | 275 | 219 | 217 | 286 | 254 | 256 |
| | 2 | 276 | 254 | 245 | 224 | 265 | 237 | 285 | 286 | 277 | 251 |
| | 3 | 270 | 194 | 226 | 240 | 263 | 286 | 254 | 259 | 228 | 269 |
| | 4 | 198 | 264 | 231 | 200 | 255 | 252 | 240 | 244 | 266 | 249 |
| | 5 | 235 | 215 | 198 | 255 | 276 | 269 | 251 | 238 | 259 | 239 |
| | 6 | 210 | 245 | 226 | 251 | 266 | 222 | 261 | 218 | 261 | 261 |
| Perlakuan II | 1 | 211 | 219 | 211 | 251 | 266 | 214 | 226 | 201 | 241 | 244 |
| | 2 | 208 | 195 | 194 | 241 | 179 | 189 | 198 | 209 | 225 | 197 |
| | 3 | 231 | 201 | 201 | 183 | 211 | 190 | 261 | 218 | 227 | 261 |
| | 4 | 172 | 221 | 231 | 176 | 207 | 186 | 241 | 214 | 216 | 198 |
| | 5 | 148 | 215 | 221 | 163 | 216 | 165 | 253 | 204 | 214 | 200 |
| | 6 | 226 | 205 | 241 | 157 | 203 | 174 | 251 | 203 | 205 | 215 |
| Perlakuan III | 1 | 162 | 153 | 148 | 153 | 205 | 195 | 142 | 139 | 156 | 147 |
| | 2 | 136 | 149 | 122 | 149 | 120 | 157 | 164 | 124 | 149 | 151 |
| | 3 | 157 | 145 | 157 | 132 | 197 | 182 | 152 | 165 | 147 | 159 |
| | 4 | 146 | 150 | 120 | 146 | 189 | 133 | 146 | 134 | 162 | 157 |
| | 5 | 101 | 107 | 153 | 144 | 155 | 123 | 125 | 156 | 171 | 154 |
| | 6 | 105 | 126 | 133 | 170 | 131 | 165 | 138 | 148 | 165 | 148 |



Lampiran 8 Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer

Tabel Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer (%) |
|---------------|-------------|---|
| Kontrol | 1 | 14.6 |
| | 2 | 14.3 |
| | 3 | 15 |
| | 4 | 16.2 |
| | 5 | 11 |
| | 6 | 16 |
| Perlakuan I | 1 | 17 |
| | 2 | 19 |
| | 3 | 16 |
| | 4 | 19 |
| | 5 | 21 |
| | 6 | 19.3 |
| Perlakuan II | 1 | 23 |
| | 2 | 21 |
| | 3 | 21 |
| | 4 | 19 |
| | 5 | 20 |
| | 6 | 21 |
| Perlakuan III | 1 | 23 |
| | 2 | 20 |
| | 3 | 22 |
| | 4 | 23 |
| | 5 | 22.1 |
| | 6 | 24 |

Lampiran 9 Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder

Tabel Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder (%) |
|----------------------|--------------------|--|
| Kontrol | 1 | 12.5 |
| | 2 | 14.8 |
| | 3 | 18.6 |
| | 4 | 18.6 |
| | 5 | 14.4 |
| | 6 | 16 |
| Perlakuan I | 1 | 24 |
| | 2 | 26.7 |
| | 3 | 25 |
| | 4 | 30 |
| | 5 | 21 |
| | 6 | 20 |
| Perlakuan II | 1 | 34 |
| | 2 | 33 |
| | 3 | 33 |
| | 4 | 29 |
| | 5 | 32 |
| | 6 | 31 |
| Perlakuan III | 1 | 43 |
| | 2 | 31 |
| | 3 | 52 |
| | 4 | 34 |
| | 5 | 41 |
| | 6 | 33 |

Lampiran 10 Hasil Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier

Tabel Penghitungan Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier

| Nama Kelompok | Kode Sampel | Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier (%) |
|---------------|-------------|--|
| Kontrol | 1 | 18.6 |
| | 2 | 19.1 |
| | 3 | 18.2 |
| | 4 | 20.1 |
| | 5 | 17.8 |
| | 6 | 22.1 |
| Perlakuan I | 1 | 24.6 |
| | 2 | 23.7 |
| | 3 | 23.1 |
| | 4 | 27.2 |
| | 5 | 24.1 |
| | 6 | 19.8 |
| Perlakuan II | 1 | 31.2 |
| | 2 | 30.1 |
| | 3 | 27.2 |
| | 4 | 28.7 |
| | 5 | 26.8 |
| | 6 | 27.8 |
| Perlakuan III | 1 | 40.8 |
| | 2 | 46.2 |
| | 3 | 49.6 |
| | 4 | 49.3 |
| | 5 | 46.8 |
| | 6 | 40.3 |



Lampiran 11 Uji Normalitas Sel Granulosa Folikel Sekunder

Case Processing Summary

| | | Cases | | | | | |
|----------|-------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Sekunder | Sipermetrin | 24 | 100.0% | 0 | 0.0% | 24 | 100.0% |

Tests of Normality

| | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|-------------|---------------------------------|----|-------------------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Sekunder | Sipermetrin | .091 | 24 | .200 [*] | .966 | 24 | .563 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 12 Uji Normalitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

Case Processing Summary

| | | Cases | | | | | |
|-------------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Sipermetrin | | | | | | | |
| GranPrim | Kontrol | 24 | 100.0% | 0 | 0.0% | 24 | 100.0% |

Tests of Normality

| | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------|---------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Sipermetrin | | | | | | | |
| GranPrim | Kontrol | .204 | 24 | .011 | .933 | 24 | .116 |

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 13 Uji Normalitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

Explore

Case Processing Summary

| | Cases | | | | | |
|------------------------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | Valid | | Missing | | Total | |
| | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Residual for Trans_Granulosa | 24 | 100.0% | 0 | .0% | 24 | 100.0% |

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Residual for Trans_Granulosa | .113 | 24 | .200* | .951 | 24 | .285 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 14 Uji Normalitas Indeks Apoptosis Granulosa Folikel Primer

Case Processing Summary

| | | Cases | | | | | |
|------------|-------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| ApopPrimer | Sipermetrin | 24 | 100.0% | 0 | 0.0% | 24 | 100.0% |

Tests of Normality

| | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------------|-------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| ApopPrimer | Sipermetrin | .159 | 24 | .118 | .945 | 24 | .212 |

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 15 Uji Normalitas Indeks Apoptosis Folikel Sekunder

Case Processing Summary

| | | Cases | | | | | |
|--------------|-------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Sipermetrin | | | | | | | |
| ApopSekunder | Sipermetrin | 24 | 100.0% | 0 | 0.0% | 24 | 100.0% |

Tests of Normality

| | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|--------------|-------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| ApopSekunder | Sipermetrin | .139 | 24 | .200* | .956 | 24 | .368 |

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 16 Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

Test of Homogeneity of Variances

| GranSekunder | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 2.337 | 3 | 20 | .104 |



Lampiran 17 Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

Test of Homogeneity of Variances

| GranPrim | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 5.814 | 3 | 20 | .005 |



Lampiran 18 Uji Homogenitas Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: Sel Granulosa

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 9.192 | 3 | 20 | .001 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Kelompok



Lampiran 19 Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer

Test of Homogeneity of Variances

| ApopPrimer | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| .288 | 3 | 20 | .834 |



Lampiran 20 Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder

Test of Homogeneity of Variances

ApopSknder

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.595 | 3 | 20 | .006 |



Lampiran 21 Uji Homogenitas Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier

Levene's Test of Equality of Error Variance

Dependent Variable: Indeks Apoptosis

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 2.921 | 3 | 20 | .059 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Kelompok



Lampiran 22 One Way Anova Jumlah Sel Granulosa Folikel Primer

Descriptives

GranPrim

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol | 6 | 84.8667 | 3.92054 | 1.60056 | 80.7523 | 88.9810 | 80.00 | 88.60 |
| P1 | 6 | 97.8833 | 1.85840 | .75869 | 95.9331 | 99.8336 | 95.10 | 100.40 |
| P2 | 6 | 105.3333 | 19.70448 | 8.04432 | 84.6547 | 126.0119 | 79.00 | 133.00 |
| P3 | 6 | 110.5000 | 27.00185 | 11.02346 | 82.1633 | 138.8367 | 78.00 | 155.00 |
| Total | 24 | 99.6458 | 18.54618 | 3.78572 | 91.8145 | 107.4772 | 78.00 | 155.00 |

Test of Homogeneity of Variances

GranPrim

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 5.814 | 3 | 20 | .005 |

ANOVA

GranPrim

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 2230.145 | 3 | 743.382 | 2.617 | .079 |
| Within Groups | 5680.955 | 20 | 284.048 | | |
| Total | 7911.100 | 23 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GranPrim
Tamhane

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | -13.01667 [*] | 1.77127 | .001 | -19.3842 | -6.6492 |
| | P2 | -20.46667 | 8.20201 | .271 | -53.5741 | 12.6408 |
| | P3 | -25.63333 | 11.13905 | .343 | -71.3853 | 20.1186 |
| P1 | Kontrol | 13.01667 [*] | 1.77127 | .001 | 6.6492 | 19.3842 |
| | P2 | -7.45000 | 8.08002 | .952 | -41.0469 | 26.1469 |
| | P3 | -12.61667 | 11.04954 | .887 | -58.7606 | 33.5273 |
| P2 | Kontrol | 20.46667 | 8.20201 | .271 | -12.6408 | 53.5741 |
| | P1 | 7.45000 | 8.08002 | .952 | -26.1469 | 41.0469 |
| | P3 | -5.16667 | 13.64653 | .999 | -50.6982 | 40.3649 |
| P3 | Kontrol | 25.63333 | 11.13905 | .343 | -20.1186 | 71.3853 |
| | P1 | 12.61667 | 11.04954 | .887 | -33.5273 | 58.7606 |
| | P2 | 5.16667 | 13.64653 | .999 | -40.3649 | 50.6982 |

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



Lampiran 23 One Way Anova Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

Descriptives

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | Kontrol | 6 | | |
| P1 | 6 | 247.5667 | 8.90206 | 3.63425 | 238.2245 | 256.9088 | 234.70 | 256.80 |
| P2 | 6 | 216.2667 | 9.51035 | 3.88258 | 206.2862 | 226.2472 | 198.30 | 226.20 |
| P3 | 6 | 169.9167 | 15.33576 | 6.26080 | 153.8228 | 186.0106 | 154.10 | 191.70 |
| Total | 24 | 230.2958 | 45.65488 | 9.31926 | 211.0175 | 249.5742 | 154.10 | 308.60 |

Test of Homogeneity of Variances

| GranSekndr | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 2.337 | 3 | 20 | .104 |

ANOVA

| GranSekndr | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 44432.621 | 3 | 14810.874 | 84.444 | .000 |
| Within Groups | 3507.848 | 20 | 175.392 | | |
| Total | 47940.470 | 23 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: GranSekndr
LSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | 39.86667* | 7.64618 | .000 | 23.9170 | 55.8163 |
| | P2 | 71.16667* | 7.64618 | .000 | 55.2170 | 87.1163 |
| | P3 | 117.51667* | 7.64618 | .000 | 101.5670 | 133.4663 |
| P1 | Kontrol | -39.86667* | 7.64618 | .000 | -55.8163 | -23.9170 |
| | P2 | 31.30000* | 7.64618 | .001 | 15.3503 | 47.2497 |
| | P3 | 77.65000* | 7.64618 | .000 | 61.7003 | 93.5997 |
| P2 | Kontrol | -71.16667* | 7.64618 | .000 | -87.1163 | -55.2170 |
| | P1 | -31.30000* | 7.64618 | .001 | -47.2497 | -15.3503 |
| | P3 | 46.35000* | 7.64618 | .000 | 30.4003 | 62.2997 |
| P3 | Kontrol | -117.51667* | 7.64618 | .000 | -133.4663 | -101.5670 |
| | P1 | -77.65000* | 7.64618 | .000 | -93.5997 | -61.7003 |
| | P2 | -46.35000* | 7.64618 | .000 | -62.2997 | -30.4003 |

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



Lampiran 24 One Way Anova Jumlah Sel Granulosa Folikel Tersier

Case Processing Summary

| | Cases | | | | | |
|--------------------------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|
| | Included | | Excluded | | Total | |
| | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| Sel_Granulosa * Kelompok | 24 | 100.0% | 0 | .0% | 24 | 100.0% |

Report

Sel_Granulosa

| Kelompok | Mean | N | Std. Deviation |
|----------|----------|----|----------------|
| Kontrol | 308.0667 | 6 | 27.02981 |
| P1 | 248.1000 | 6 | 7.79564 |
| P2 | 210.7333 | 6 | 10.66390 |
| P3 | 148.5833 | 6 | 9.09251 |
| Total | 228.8708 | 24 | 60.94888 |

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

| Kelompok | Value Label | N |
|----------|-------------|---|
| 1.00 | Kontrol | 6 |
| 2.00 | P1 | 6 |
| 3.00 | P2 | 6 |
| 4.00 | P3 | 6 |

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Sel_Granulosa

| Source | Type III Sum of Squares ^a | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 80500.755 ^a | 3 | 26833.585 | 108.683 | .000 |
| Intercept | 1257164.800 | 1 | 1257164.800 | 5090.895 | .000 |
| Kelompok | 80500.755 | 3 | 26833.585 | 108.683 | .000 |
| Error | 4938.875 | 20 | 246.944 | | |
| Total | 1342604.230 | 24 | | | |
| Corrected Total | 85439.630 | 23 | | | |

a. R Squared = .942 (Adjusted R Squared = .934)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sel_Granulosa

Tamhane

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | -69.9667* | 11.48465 | .013 | -104.8924 | -35.0410 |
| | P2 | -97.3333* | 11.86261 | .001 | -119.3779 | -75.2887 |
| | P3 | -159.4833* | 11.84248 | .000 | -182.1111 | -136.8555 |
| P1 | Kontrol | 69.9667* | 11.48465 | .013 | 35.0410 | 104.8924 |
| | P2 | -37.3667* | 5.39275 | .000 | -48.1111 | -26.6222 |
| | P3 | -99.5167* | 4.88954 | .000 | -109.2222 | -89.8111 |
| P2 | Kontrol | 97.3333* | 11.86261 | .001 | 75.2887 | 119.3779 |
| | P1 | 37.3667* | 5.39275 | .000 | 26.6222 | 48.1111 |
| | P3 | -62.1500* | 5.72119 | .000 | -73.6667 | -50.6333 |
| P3 | Kontrol | 159.4833* | 11.84248 | .000 | 136.8555 | 182.1111 |
| | P1 | 99.5167* | 4.88954 | .000 | 90.9350 | 108.0983 |
| | P2 | -62.1500* | 5.72119 | .000 | -73.6667 | -50.6333 |

Based on observed means.
*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 25 One Way Anova Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Primer

Descriptives

ApopPrimer

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol | 6 | 14.5167 | 1.88087 | .76786 | 12.5428 | 16.4905 | 11.00 | 16.20 |
| P1 | 6 | 18.5500 | 1.78185 | .72744 | 16.6801 | 20.4199 | 16.00 | 21.00 |
| P2 | 6 | 20.8333 | 1.32916 | .54263 | 19.4385 | 22.2282 | 19.00 | 23.00 |
| P3 | 6 | 22.3500 | 1.36198 | .55603 | 20.9207 | 23.7793 | 20.00 | 24.00 |
| Total | 24 | 19.0625 | 3.36798 | .68749 | 17.6403 | 20.4847 | 11.00 | 24.00 |

Test of Homogeneity of Variances

ApopPrimer

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .288 | 3 | 20 | .834 |

ANOVA

ApopPrimer

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 209.225 | 3 | 69.742 | 26.994 | .000 |
| Within Groups | 51.672 | 20 | 2.584 | | |
| Total | 260.896 | 23 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ApopPrimer

LSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | -4.03333 [*] | .92801 | .000 | -5.9691 | -2.0975 |
| | P2 | -6.31667 [*] | .92801 | .000 | -8.2525 | -4.3809 |
| | P3 | -7.83333 [*] | .92801 | .000 | -9.7691 | -5.8975 |
| P1 | Kontrol | 4.03333 [*] | .92801 | .000 | 2.0975 | 5.9691 |
| | P2 | -2.28333 [*] | .92801 | .023 | -4.2191 | -.3475 |
| | P3 | -3.80000 [*] | .92801 | .001 | -5.7358 | -1.8642 |
| P2 | Kontrol | 6.31667 [*] | .92801 | .000 | 4.3809 | 8.2525 |
| | P1 | 2.28333 [*] | .92801 | .023 | .3475 | 4.2191 |
| | P3 | -1.51667 | .92801 | .118 | -3.4525 | .4191 |
| P3 | Kontrol | 7.83333 [*] | .92801 | .000 | 5.8975 | 9.7691 |
| | P1 | 3.80000 [*] | .92801 | .001 | 1.8642 | 5.7358 |
| | P2 | 1.51667 | .92801 | .118 | -.4191 | 3.4525 |

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



Lampiran 26 One Way Anova Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder

Descriptives

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|---------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol | 6 | 15.8167 | 2.43180 | .99278 | 13.2646 | 18.3687 | 12.50 | 18.60 |
| P1 | 6 | 24.4500 | 3.68985 | 1.50638 | 20.5777 | 28.3223 | 20.00 | 30.00 |
| P2 | 6 | 32.0000 | 1.78885 | .73030 | 30.1227 | 33.8773 | 29.00 | 34.00 |
| P3 | 6 | 39.0000 | 7.92465 | 3.23522 | 30.6836 | 47.3164 | 31.00 | 52.00 |
| Total | 24 | 27.8167 | 9.81360 | 2.00319 | 23.6727 | 31.9606 | 12.50 | 52.00 |

Test of Homogeneity of Variances

| ApopSkndr | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 5.595 | 3 | 20 | .006 |

ANOVA

| ApopSkndr | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1787.410 | 3 | 595.803 | 27.864 | .000 |
| Within Groups | 427.643 | 20 | 21.382 | | |
| Total | 2215.053 | 23 | | | |

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ApopSkndr
LSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | -8.63333 [*] | 2.66972 | .004 | -14.2023 | -3.0644 |
| | P2 | -16.18333 [*] | 2.66972 | .000 | -21.7523 | -10.6144 |
| | P3 | -23.18333 [*] | 2.66972 | .000 | -28.7523 | -17.6144 |
| P1 | Kontrol | 8.63333 [*] | 2.66972 | .004 | 3.0644 | 14.2023 |
| | P2 | -7.55000 [*] | 2.66972 | .010 | -13.1189 | -1.9811 |
| | P3 | -14.55000 [*] | 2.66972 | .000 | -20.1189 | -8.9811 |
| P2 | Kontrol | 16.18333 [*] | 2.66972 | .000 | 10.6144 | 21.7523 |
| | P1 | 7.55000 [*] | 2.66972 | .010 | 1.9811 | 13.1189 |
| | P3 | -7.00000 [*] | 2.66972 | .016 | -12.5689 | -1.4311 |
| P3 | Kontrol | 23.18333 [*] | 2.66972 | .000 | 17.6144 | 28.7523 |
| | P1 | 14.55000 [*] | 2.66972 | .000 | 8.9811 | 20.1189 |
| | P2 | 7.00000 [*] | 2.66972 | .016 | 1.4311 | 12.5689 |

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



Lampiran 27 One Way Anova Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Tersier

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

| Kelompok | Value Label | N |
|----------|-------------|---|
| 1.00 | Kontrol | 6 |
| 2.00 | P1 | 6 |
| 3.00 | P2 | 6 |
| 4.00 | P3 | 6 |

Levene's Test of Equality of Error Variances

Dependent Variable: Indeks_Apoptosis

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 2.921 | 3 | 20 | .059 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+Kelompok

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Indeks_Apoptosis

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 2360.123 ^a | 3 | 786.708 | 113.476 | .000 |
| Intercept | 20603.760 | 1 | 20603.760 | 2971.910 | .000 |
| Kelompok | 2360.123 | 3 | 786.708 | 113.476 | .000 |
| Error | 138.857 | 20 | 6.933 | | |
| Total | 23102.540 | 24 | | | |
| Corrected Total | 2498.780 | 23 | | | |

a. R Squared = .945 (Adjusted R Squared = .936)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Indeks_Apoptosis

LSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kontrol | P1 | -4.4333* | 1.52018 | .009 | -7.6044 | -1.2623 |
| | P2 | -9.3167* | 1.52018 | .000 | -12.4877 | -6.1456 |
| | P3 | -26.1833* | 1.52018 | .000 | -29.3544 | -23.0123 |
| P1 | Kontrol | 4.4333* | 1.52018 | .009 | 1.2623 | 7.6044 |
| | P2 | -4.8833* | 1.52018 | .004 | -8.0544 | -1.7123 |
| | P3 | -21.7500* | 1.52018 | .000 | -24.9210 | -18.5790 |
| P2 | Kontrol | 9.3167* | 1.52018 | .000 | 6.1456 | 12.4877 |
| | P1 | 4.8833* | 1.52018 | .004 | 1.7123 | 8.0544 |
| | P3 | -16.8667* | 1.52018 | .000 | -20.0377 | -13.6956 |
| P3 | Kontrol | 26.1833* | 1.52018 | .000 | 23.0123 | 29.3544 |
| | P1 | 21.7500* | 1.52018 | .000 | 18.5790 | 24.9210 |
| | P2 | 16.8667* | 1.52018 | .000 | 13.6956 | 20.0377 |

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 28 Analisis Korelasi Indeks Apoptosis Sel Granulosa Folikel Sekunder

Correlations

| | | ApopSkndr | Kelompok | Dosis |
|-----------|---------------------|-----------|----------|--------|
| ApopSkndr | Pearson Correlation | 1 | .897** | .889** |
| | Sig. (2-tailed) | | .000 | .000 |
| | N | 24 | 24 | 24 |
| Kelompok | Pearson Correlation | .897** | 1 | .983** |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | | .000 |
| | N | 24 | 24 | 24 |
| Dosis | Pearson Correlation | .889** | .983** | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | .000 | |
| | N | 24 | 24 | 24 |

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 29 Analisis Regresi Jumlah Sel Granulosa Folikel Sekunder

➔ **Regression**

Variables Entered/Removed^a

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|--------------------|-------------------|--------|
| 1 | Dosis ^b | | Enter |

a. Dependent Variable: GranSkndr

b. All requested variables entered.

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .942 ^a | .887 | .882 | 15.67301 |

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA^a

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|---------|-------------------|
| 1 | Regression | 42536.317 | 1 | 42536.317 | 173.163 | .000 ^b |
| | Residual | 5404.153 | 22 | 245.643 | | |
| | Total | 47940.470 | 23 | | | |

a. Dependent Variable: GranSkndr

b. Predictors: (Constant), Dosis

Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|---------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | 294.340 | 5.824 | | 50.537 | .000 |
| | Dosis | -5.693 | .433 | -.942 | -13.159 | .000 |

a. Dependent Variable: GranSkndr



Lampiran 30 Analisis Regresi Indeks Apoptosis Granulosa Folikel Primer

➔ Regression

Variables Entered/Removed^a

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|--------------------|-------------------|--------|
| 1 | Dosis ^b | | Enter |

a. Dependent Variable: Apopprim

b. All requested variables entered.

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .894 ^a | .799 | .790 | 1.54322 |

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA^a

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 208.503 | 1 | 208.503 | 87.550 | .000 ^b |
| | Residual | 52.394 | 22 | 2.382 | | |
| | Total | 260.896 | 23 | | | |

a. Dependent Variable: Apopprim

b. Predictors: (Constant), Dosis

Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|--------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | 14.579 | .573 | | 25.421 | .000 |
| | Dosis | .399 | .043 | .894 | 9.357 | .000 |

a. Dependent Variable: Apopprim



Lampiran 31 Analisis Regresi Indeks Apoptosis Sel granulosa Folikel Sekunder

➔ Regression

Variables Entered/Removed^a

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|--------------------|-------------------|--------|
| 1 | Dosis ^b | | Enter |

a. Dependent Variable: ApopSkndr

b. All requested variables entered.

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .889 ^a | .791 | .782 | 4.58677 |

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA^a

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 1752.207 | 1 | 1752.207 | 83.286 | .000 ^b |
| | Residual | 462.846 | 22 | 21.038 | | |
| | Total | 2215.053 | 23 | | | |

a. Dependent Variable: ApopSkndr

b. Predictors: (Constant), Dosis

Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|-------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | 14.818 | 1.704 | | 8.694 | .000 |
| | Dosis | 1.155 | .127 | .889 | 9.126 | .000 |

a. Dependent Variable: ApopSkndr



Lampiran 32 Analisis Regresi Indeks Apoptosis Sel granulosa Folikel Tersier

Regression

Variables Entered/Removed^a

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|--------------------|-------------------|--------|
| 1 | Dosis ^a | . | Enter |

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Indeks_Apoptosis

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .856 ^a | .733 | .721 | 5.50182 |

a. Predictors: (Constant), Dosis

ANOVA^b

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 1832.839 | 1 | 1832.839 | 60.550 | .000 ^a |
| | Residual | 665.941 | 22 | 30.270 | | |
| | Total | 2498.780 | 23 | | | |

a. Predictors: (Constant), Dosis

b. Dependent Variable: Indeks_Apoptosis

Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|-------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | 16.006 | 2.045 | | 7.829 | .000 |
| | Dosis | 1.182 | .152 | .856 | 7.781 | .000 |

a. Dependent Variable: Indeks_Apoptosis