



**PENGARUH ANTOSIANIN TERHADAP KETEBALAN
EPITEL, INDEKS APOPTOSIS DAN EKSPRESI p53
SEL EPITEL VAGINA PADA TIKUS PUTIH (*Rattus
norvegicus*) OVARIEKTOMI**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
CUCUN SETYA FERDINA
156070400111029**

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

TESIS

**PENGARUH ANTOSIANIN TERHADAP KETEBALAN
EPITEL, INDEKS APOPTOSIS DAN EKSPRESI p53 SEL
EPITEL VAGINA PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
OVARIEKTOMI**

OLEH:
CUCUN SETYA FERDINA
156070400111029

Dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal : 22 Agustus 2017
Dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 195502011985032001
Ketua

Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP. 195804141987012001
Anggota Penguji

Dr. dr. Kusnarman Keman, SpOG (K)
NIP. 195407301982031004
Anggota Penguji

Prof. Dr. dr. Muljohadi Ali, Sp. FK
NIP. 194709061978031002
Anggota Penguji



IDENTITAS TIM PENGUJI

Dr. dr. Retty Rathawati, M.Sc	Laporatorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
Dr. dr Sri Andarini, M.Kes	Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
Dr. dr. Kusnarman Keman, SpOG (K)	Ka. Bag. Obstetri dan Ginekologi RSUD Saiful Anwar
Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali	Laporatorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

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,

COPY



Nama : Cucun Setya Ferdina
NIM : 156070400111029
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran



RIWAYAT HIDUP

Cucun Setya Ferdina, lahir di Kediri, 23 September 1989. Anak pertama dari dua bersaudara, putri Bapak Moch. Yasin dan Ibu Siti Nurhayatun. Lulus dari SDN Woromarto I tahun 2002, lulus dari SMP Negeri 1 Kertosono tahun 2005 dan lulus dari SMA Negeri 2 Jombang tahun 2008.

Tahun 2008 melanjutkan pendidikan DIII

Kebidanan di Poltekkes Kemenkes Malang, lulus tahun 2011. Melanjutkan pendidikan DIV Bidan Pendidik di Poltekkes Kemenkes Surakarta, lulus tahun 2012. Pada tahun 2015 menempuh pendidikan Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2013 sampai sekarang bekerja di Akademi Kebidanan Medika Wiyata Kediri.





RINGKASAN

Cucun Setya Ferdina

Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing : Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc; Anggota : Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.

Menopause merupakan fenomena fisiologis pada wanita yang terkait dengan berhentinya fungsi ovarium dan juga siklus menstruasi. Disfungsi ovarium menyebabkan penurunan kadar estrogen. Konsekuensi dari turunnya kadar estrogen yang dihasilkan akan menimbulkan efek fenotipik pada regenerasi dan perbaikan jaringan serta munculnya berbagai tanda-tanda dan gejala. Salah satu organ yang mengalami dampak akibat terjadinya hipoestrogen adalah vagina. Pada vagina terjadi atrofi dan penipisan epitel. Estrogen menginduksi proliferasi sel epitel dan diferensiasi, sedangkan hasil deplesi estrogen adalah atrofi disertai dengan apoptosis. Apoptosis terjadi sebagai mekanisme pertahanan pada ketika terjadi kerusakan sel. Apoptosis dapat diaktifkan oleh p53 yang berperan sebagai regulator siklus sel, yang memegang peranan penting dalam adanya respon stres selular.

Pada saat menopause penurunan kadar estrogen merupakan faktor yang mempengaruhi meningkatnya stres oksidatif. Stres oksidatif merupakan kondisi kerusakan oksidatif yang terjadi ketika adanya ketidakseimbangan antara radikal bebas dan pertahanan antioksidan. Antosianin merupakan salah satu bioaktif dalam menangkal radikal bebas dan paling dikenal sebagai antioksidan. Konsumsi makanan kaya antioksidan bisa menjadi strategi yang efektif untuk mengurangi stres oksidatif dan gejala dan komplikasi yang terkait dengan wanita yang mengalami menopause.

Penelitian ini menggunakan desain *True Experimental* dengan pendekatan *posttest only group control design*. Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel vagina, indeks apoptosis, dan ekspresi p53 pada sel epitel vagina, mengetahui korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan indeks apoptosis serta mengetahui korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan ekspresi p53 pada tikus ovariectomi. Penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu : 1) kelompok kontrol (K) yang dilakukan ovariectomi tetapi tidak diberikan antosianin; 2) Kelompok perlakuan 1 (P1) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr; 3) Kelompok perlakuan 2 (P2) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB/hr; dan 4) Kelompok perlakuan 3 (P3) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr.

Pada saat memulai penelitian hewan coba diaklimatisasi terlebih dahulu, kemudian hewan coba diovariectomi untuk memperoleh kondisi hipoestrogen. Kondisi hipoestrogen terjadi setelah 28 hari post ovariectomi. Hewan coba yang telah dalam kondisi hipoestrogen diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hari, 40 mg/KgBB/hari, dan 80 mg/KgBB/hari selama 30 hari, kemudian hewan coba diterminasi dan dilakukan pengambilan organ vagina.

Kemudian dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui ketebalan epitel vagina yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dan diukur menggunakan *software image raster*. Indeks apoptosis pada sel epitel vagina menggunakan Tunel assay dan ekspresi p53 menggunakan metode imunohistokimia. Kemudian dilakukan analisis statistik uji komparasi untuk mengetahui pengaruh pemberian antosianin terhadap ketebalan epitel vagina, indeks apoptosis dan ekspresi p53, serta menggunakan uji korelasi untuk mengetahui korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan indeks apoptosis, dan antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi.

Hasil penelitian pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel vagina, indeks apoptosis dan ekspresi p53 menggunakan uji *One Way Anova* yang kemudian dilanjutkan dengan uji LSD hasilnya terdapat perbedaan yang bermakna rerata ketebalan epitel vagina, indeks apoptosis dan ekspresi p53 pada kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil analisis korelasi ketebalan epitel dengan indeks apoptosis menggunakan uji korelasi



Pearson menunjukkan bahwa $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0,05$, sehingga dapat diartikan bahwa H_0 ditolak dan dinyatakan ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dengan koefisien korelasi sebesar (-0,703). Sedangkan hasil analisis korelasi ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 menunjukkan bahwa $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0,05$, dapat diartikan bahwa H_0 ditolak dan dinyatakan ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel vagina dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dengan koefisien korelasi sebesar (-0,845).

Vagina merupakan organ yang sensitif akibat penurunan kadar estrogen pada wanita postmenopause. Hilangnya produksi estrogen ovarium berhubungan dengan penipisan epitel vagina. Pemberian antosianin berpengaruh secara signifikan dalam meningkatkan ketebalan epitel vagina pada berbagai kelompok. Antosianidin memiliki potensi untuk berikatan dengan reseptor estrogen α . Antosianidin menunjukkan aktivitas estrogenik yang signifikan. Stres oksidatif mengalami peningkatan pada organ vagina tikus ovariektomi. Antosianin yang merupakan antioksidan, berfungsi melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh stres oksidatif. Antosianin meningkatkan ekspresi Bcl-2 (protein anti apoptosis), di sisi lain antosianin dapat menurunkan ekspresi Bad dan Bax, anggota keluarga protein BCL-2 yang pro-apoptosis dan juga mengurangi atau menekan ekspresi p53, dan caspase-3, yaitu protease yang terkait dengan aktivasi kematian sel. Antosianin menekan apoptosis pada jalur ekstrinsik yang diinduksi oleh stres oksidatif.

Kesimpulan dari penelitian ini bahwa antosianin dapat meningkatkan ketebalan epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi. Antosianin dapat menurunkan ekspresi p53 dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus ovariektomi. Terdapat korelasi dengan arah negatif dan kekuatan korelasi kuat antara ketebalan epitel vagina dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi serta terdapat korelasi dengan arah negatif dengan kekuatan korelasi kuat antara ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi.



SUMMARY

Cucun Setya Ferdina

The Effect of Anthocyanins on Epithelial Thickness, Apoptosis Index and p53 Expression on Vaginal Epithelial Cell of Ovariectomized Rats, Master of Midwifery Program of Medicine Faculty. Chairman of Supervisor Commission: Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, Member: Dr.dr. Sri Andarini, M.Kes.

Menopause is natural physiological phenomenon in women dealing with permanent cessation of menstruation and ovarian function. Ovarian dysfunction causes a decrease in estrogen levels. The consequences of the decreased estrogen levels produced will have a phenotypic effect on regeneration and tissue repair and the emergence of various signs and symptoms. One of the organs affected by the occurrence of hypoestrogen is the vagina. In the vagina occurs atrophy and epithelial depletion. Estrogen induces epithelial cell proliferation and differentiation, whereas estrogen depletion results are atrophy accompanied by apoptosis. Apoptosis occurs as a defense mechanism in the event of cell damage. Apoptosis can be activated by p53 which acts as a cell cycle regulator, which plays an important role in the presence of cellular stress responses.

In menopause period, the estrogen deficiency impacts on the increasing of oxidative stress. Oxidative stress is a kind of imbalance among free radical production and antioxidant defenseless. Anthocyanins is one of bioactive in warding off free radical and best known as antioxidant. However, by consuming high antioxidant food can be effective strategy to reduce oxidative stress, complication and symptom regarding menopause that all women experience.

This research applied true experimental design and post test only group control design approach. In addition, it used female white rat (*Rattus norvegicus*). This research aimed at improving the effect of anthocyanin on vaginal epithelial thickness, apoptotic index, and p53 expression on vaginal epithelial cells, and also knowing the correlation between vaginal epithelial thickness with apoptotic index and knowing the correlation between vaginal epithelial thickness with p53 expression in ovariectomized white rats (*Rattus norvegicus*). This research was divided into four groups, they were; 1) Control group (K) performing ovariectomy but it was not given anthocyanin; 2) Treatment group of 1, performing ovariectomy and it was given anthocyanin at doses of 20 mg/KgBB/day, 3) Treatment group of 2, performing ovariectomy and it was given anthocyanin at doses of 40 mg/KgBB/day and 4) Treatment group of 3, performing ovariectomy and it was given anthocyanin at doses of 80 mg/KgBB/day.

At the beginning of the research, first the rat was acclimatized and then it was ovariectomized to reach hypoestrogen. In addition, hypoestrogen occurs after 28 days of ovariectomy. The rats had been in hypoestrogen was given 20 mg/KgBB/day, 40 mg/KgBB/day 80 mg/KgBB/day for 30 days. Afterwards it was terminated and the vaginal organ was taken.

Then, it was examined to determine the thickness of the vaginal epithelium observed using a light microscope and measured using image raster software. The apoptotic index of vaginal epithelial cells using TUNEL assay and p53 expression using immunohistochemical methods. The statistical analysis of comparative test was conducted to determine the effect of anthocyanin administration on vaginal epithelial thickness, apoptosis index and p53 expression, and to use correlation test to determine correlation between vaginal epithelial thickness with apoptosis index, and between epithelial thickness and p53 expression in vaginal epithelial cells of ovariectomized white rat (*Rattus norvegicus*).

The research showed that the effect of anthocyanin on vaginal epithelial thickness, apoptosis index and p53 expression using One Way Anova test which then continued with LSD test result there is a significant difference mean of vaginal epithelial thickness, apoptosis index and p53 expression in control and treatment group. The result of correlation analysis of epithelial thickness with apoptosis index using Pearson correlation test showed that $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0,05$, so it can be interpreted that H_0 is rejected and stated there is significant relation between epithelial thickness with apoptosis index on vaginal epithelial cell of ovariectomized white rat (*Rattus norvegicus*) with correlation



coefficient of (-0.703). While the results of correlation analysis of vaginal epithelial thickness and p53 expression showed that $p\text{-value} = 0.000 < \alpha = 0.05$, it can be interpreted that H_0 is rejected and stated there is a significant relationship between vaginal epithelial thickness with p53 expression on mouse white vaginal epithelial cells (*Rattus norvegicus*) ovariectomy with correlation coefficient of (-0.845).

Vagina is a sensitive organ due to decreased estrogen levels in postmenopausal women. Loss of ovarian estrogen production is associated with depletion of the vaginal epithelium. The administration of anthocyanin significantly affected the thickness of vaginal epithelium in various groups. Antosianidins have the potential to bind to α estrogen receptors. Anthocyanidins exhibit significant estrogenic activity. Oxidative stress has increased in the vaginal organs of ovarian rats. An antioxidant, which is an antioxidant, protects cells from apoptosis induced by oxidative stress. Antocyanin increases the expression of Bcl-2 (anti-apoptotic protein), on the other hand antocyanin may decrease the expression of Bad and Bax, a member of the pro-apoptotic BCL-2 protein family and also reduce or suppress p53, and caspase-3 expression, with activation of cell death. Anthocyanins suppress apoptosis in extrinsic pathways induced by oxidative stress.

The conclusion is anthocyanin can increase vaginal epithelial cell of ovariectomised white rats. However, anthocyanins can decrease p53 expression apoptosis index vaginal epithelial cell of ovariectomised white rats. In addition, there was a positive correlation with moderate correlation strength between p53 expression and vaginal epithelial apoptotic cell index in white rats (*Rattus norvegicus*) that given anthocyanin.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, berkat limpahan rahmat dan HidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul : Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Ovariectomi.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih 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, dan pembimbing II yang telah memberi saran, dukungan dan fasilitas dalam menyelesaikan tesis ini dan dalam menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG(K) selaku ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya malang.
4. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc selaku ketua komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Kusnarnan Keman, SpOG (K) selaku penguji I yang telah banyak memberikan motivasi, masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.



6. Prof. Dr. dr. Mohammad Muljohadi Ali selaku penguji II yang telah banyak memberikan motivasi, dukungan, masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.

7. Ayahanda, ibunda, suami, grup MSC dan semua teman - teman yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan pendidikan dan tesis ini.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan/tepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun untuk perbaikan tulisan ini.

Malang, Agustus 2017

Penulis



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	v
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	vi
HALAMAN PERUNTUKAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL	xxi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Menopause	8
2.1.1 Pengertian	8
2.1.2 Tanda dan Gejala Menopause	8
2.1.3 Fisiologi Menopause	10
2.2 Vagina	12
2.2.1 Definisi	12
2.2.2 Epitel Vagina	13
2.2.3 Epitel Vagina pada Masa Menopause	14
2.3 Apoptosis	16
2.3.1 Pengertian Apoptosis	16
2.3.2 Fungsi Apoptosis	17
2.3.3 Mekanisme Apoptosis	18
2.4 Protein p53	22
2.4.1 Definisi	22
2.4.2 Aktivasi p53	23



2.4.3 Peran p53 Sebagai Sensor Stres Oksidatif	25
2.5 Stres Oksidatif	27
2.5.1 Definisi Stres Oksidatif	27
2.5.2 Mekanisme Stres Oksidatif	27
2.5.3 Stres Oksidatif pada Menopause	30
2.6 Antioksidan	32
2.6.1 Definisi Antioksidan	32
2.6.2 Klasifikasi Antioksidan	33
2.6.3 Mekanisme Kerja Antioksidan	34
2.7 Flavonoid	35
2.8 Antosianin	36
2.8.1 Definisi Antosianin	36
2.8.2 Struktur Kimia	36
2.8.3 Efek Fisiologis	37
2.8.4 Bioavailabilitas	39
2.8.5 Antosianin Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas</i> L)	39
2.8.6 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	40
BAB 3 KERANGKA KONSEP	42
3.1 Kerangka Teori	42
3.2 Kerangka Konsep Penelitian	46
3.3 Hipotesis	47
BAB 4 METODE PENELITIAN	48
4.1 Desain Penelitian	48
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	48
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian	49
4.4 Variabel Penelitian	50
4.5 Definisi Operasional	51
4.6 Alur Penelitian	52
4.7 Pengolahan dan Analisis Data	53
4.8 Prosedur Penelitian	53
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	60
5.1 Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi	60
5.2 Pengaruh Antosianin terhadap Indeks poptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi	64
5.3 Pengaruh Antosianin terhadap Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi	68
5.4 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin	72
5.5 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin	73
5.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Indeks Apoptosis dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin	75
BAB 6 PEMBAHASAN	76



6.1 Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	76
6.2 Pengaruh Antosianin terhadap Indeks poptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	79
6.3 Pengaruh Antosianin terhadap Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	82
6.4 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.....	84
6.5 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.....	85
6.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Indeks Apoptosis dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.....	87
6.7 Keterbatasan Penelitian.....	89
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	90
7.1 Kesimpulan.....	90
7.2 Saran.....	90
DAFTAR PUSTAKA.....	91
LAMPIRAN.....	104
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	129



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Penelitian..... 50

Tabel 4.2 Definisi Operasional Penelitian 51

Tabel 5.1 Analisis Statistik Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan 62

Tabel 5.2 Analisis Statistik Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan 66

Tabel 5.3 Analisis Statistik Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan 70

Tabel 5.4 Analisis Statistik Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin 72

Tabel 5.5 Analisis Statistik Korelasi Ketebalan Epitel Dan Ekspresi p53 Pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin 74

Tabel 5.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel dengan Indeks Apoptosis dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel dengan Ekspresi p53 Pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin 75



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Perubahan Hormon pada Masa Menopause.....	11
Gambar 2.2 Struktur Vagina.....	13
Gambar 2.3 Perubahan Fisiologi pada Atrofi Vagina.....	15
Gambar 2.4 Perbandingan Ketebalan Epitel Vagina Ovariektomi dan Tidak Ovariektomi.....	16
Gambar 2.5 Apoptosis Jalur Intrinsik dan Jalur Ekstrinsik.....	20
Gambar 2.6 Aktivasi p53.....	23
Gambar 2.7 Aktivasi p53 dalam Menanggapi Kerusakan DNA dan Tekanan Oksidatif.....	26
Gambar 2.8 Dinamika <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) dalam Sistem Biologi.....	29
Gambar 2.9 Berbagai macam respon akibat <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS).....	30
Gambar 2.10 Rumus Struktur Antosianin.....	37
Gambar 2.11 <i>Rattus norvegicus</i>	38
Gambar 3.1 Kerangka Teori Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	42
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	46
Gambar 4.1 Alur Penelitian Pengaruh Antosianin terhadap Ekspresi p53, Indeks Apoptosis dan Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi.....	52
Gambar 5.1 Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis.....	60
Gambar 5.2 Histogram Perbandingan Ketebalan Epitel Vagina Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan.....	63
Gambar 5.3 Apoptosis Sel Epitel Vagina Pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Ovariektomi Pada Kelompok Kontrol Dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis.....	64



Gambar 5.4 Histogram Perbandingan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan..... 67

Gambar 5.5 Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Pada Kelompok Kontrol Dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis..... 68

Gambar 5.6 Histogram Perbandingan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan..... 71

Gambar 5.7 Grafik Korelasi Ketebalan Epitel Dan Indeks Apoptosis Pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariectomi..... 73

Gambar 5.8 Grafik Korelasi Ketebalan Epitel Dan Ekspresi p53 Pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariectomi..... 74



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Laik Etik..... 104

Lampiran 2 Hasil Uji Kadar Antosianin..... 105

Lampiran 3 Hasil Penghitungan Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis Dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi..... 106

Lampiran 4 Hasil Uji Statistik..... 107

Lampiran 5 Cara Penggunaan software Image Raster..... 114

Lampiran 6 Prosedur Teknik Ovariectomi, Pengukuran Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53..... 117

Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian..... 123

Lampiran 8 Katalog Tunnel assay dan p53..... 126

Lampiran 9 Surat Keterangan Plagiasi..... 128



DAFTAR SINGKATAN

ALDH : Aldehida Dehydrogenase

Apaf-1 : Apoptosis activating factor

Apo1 : Apoptosis antigen 1

ASK-1 : Apoptosis Simulating Kinase-1

ATP : Adenosina trifosfat

BB : Berat badan

CAT : Catalase

DNA : Deoxyribonucleic Acid

ERT : Estrogen replacement therapy

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FasL : Fas ligan

FSH : Follicle-stimulating hormone

GPx : Glutathione Peroxidase

H₂O₂ : Hydrogen peroxide

HATs : Histone acetyltransferases

HDL : High-density lipoprotein

HLE : Human Lens Epithelial

JNK : Jun N-terminal Kinase

Kg : Kilogram

LDL : Low-density lipoprotein

LH : Luteinizing hormone

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDA : Malondialdehyd

MDM2 : Double minute-2

mg : Miligram



O₂ : Oksigen

O₂⁻ : Superoxide anion

PUFA : Polyunsaturated fatty acids

RNS : Nitrogen Reactive Spesies

ROS : Reactive Oxygen Species

SAPK : Stress Activated Protein Kinase

SOD : Superoxide Dismutase

SOR : Senyawa Oksigen Reaktif

USG : Ultrasonografi



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menopause merupakan proses fisiologis pada wanita (Reddish, 2011), yang terkait dengan berhentinya fungsi ovarium dan juga siklus menstruasi (Doshi and Agarwal, 2013). Menopause terjadi setelah periode *amenorrea* yang berlangsung lebih dari 1 tahun dan dimulai antara 40 dan 55 tahun (Scambia et al., 2000). Hilangnya aktivitas folikel ovarium bisa terjadi karena proses alami, akibat operasi, kemoterapi, atau radioterapi (Sekhon and Agarwal, 2013). Disfungsi ovarium menyebabkan penurunan kadar estrogen yang mempengaruhi banyak jaringan tubuh dan munculnya berbagai tanda-tanda dan gejala yang dapat mempengaruhi kualitas hidup perempuan pada masa menopause (Al-Azzawi and Palacios, 2009).

Salah satu organ yang mengalami dampak akibat terjadinya hipoestrogen adalah vagina. Manifestasi umum dari penurunan estrogen setelah menopause adalah atrofi vagina (Al-Baghdadi and Ewies, 2009). Bukti menunjukkan bahwa mekanisme dari atrofi vagina terkait dengan hilangnya hormon ovarium (Bachmann and Nevadunsky, 2000). Atrofi vagina merupakan *silent epidemic* yang mempengaruhi banyak wanita, dimana kondisi medis kronis dan progresif ini diperkirakan mempengaruhi 50% - 60% wanita pasca menopause (Krychman, 2007). Hasil penelitian menemukan bahwa kejadian kekeringan pada vagina meningkat, dari 3% pada perimenopause meningkat menjadi 21% pada 1 tahun setelah menopause dan 47% pada 3 tahun setelah menopause (Dennerstein et al., 2000). Terdapat dampak yang signifikan terhadap kualitas hidup dan aktivitas seksual, suatu studi mendokumentasikan bahwa 32% wanita yang mengalami



keluhan kekeringan pada vagina telah kehilangan minat untuk berhubungan seksual (Stenberg *et al.*, 1996).

Vagina adalah organ kunci dalam merespon rangsangan genital (Pessina, 2006). Frekuensi dari aktivitas seksual dan libido yang menurun banyak terjadi pada masa menopause dan terjadi peningkatan yang signifikan pada kejadian dispareunia (hubungan seksual yang menyakitkan) pada postmenopause (Dennerstein *et al.*, 2001). Hasil penelitian menunjukkan bahwa estrogen menginduksi proliferasi sel epitel dan diferensiasi, sedangkan hasil depleksi estrogen adalah atrofi disertai dengan apoptosis pada organ reproduksi tikus betina dewasa seperti organ vagina (Sato *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1995, Evans *et al.*, 2004). Ovariectomi pada tikus betina meniru banyak modifikasi fisiologis pascamenopause, baik pada fenotipik maupun fitur histologis (Giuliano, 2001).

Hasil penelitian Sato (2003) menunjukkan bahwa terjadi perubahan morfologis dalam apoptosis sel vagina yang terlihat melalui mikroskop elektron. Fragmentasi DNA pada vagina meningkat setelah dilakukan ovariectomi. Hal ini menunjukkan bahwa ovariectomi menginduksi apoptosis pada vagina.

Apoptosis terjadi secara normal pada masa perkembangan dan pada masa penuaan serta sebagai mekanisme homeostatis untuk mempertahankan populasi sel dalam jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan seperti pada reaksi imun atau ketika sel-sel yang rusak oleh penyakit atau agen berbahaya (Norbury and Hickson, 2001). Apoptosis dapat diaktifkan oleh p53 (Fridman, 2003), p53 merupakan protein yang berperan sebagai regulator siklus

sel, yang memegang peranan penting dalam adanya respon stres selular. Pada siklus sel, p53 merupakan salah satu *checkpoint* penting untuk mengenali sesuatu penyimpangan pada sel misalnya DNA yang telah rusak (Tan, 2000). p53 dapat diaktifkan karena adanya kerusakan DNA, hipoksia, atau penyimpangan ekspresi onkogen (Fridman, 2003). Aktivasi ringan dan sementara p53 dalam menanggapi



stres oksidatif tingkat rendah dapat berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Sebaliknya, aktivasi terus-menerus dari p53 dalam menanggapi tekanan oksidatif tingkat tinggi dapat mengakibatkan sel mengalami kematian dan penuaan organisme (Liu *et al.*, 2010).

Keadaan hipoestrogen dapat menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan yang berasal dari estrogen sehingga dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Benardot and Clarkson, 2001). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan molekul yang dihasilkan akibat adanya respon dari kerusakan jaringan. Molekul ini berperan dalam menginduksi terjadinya apoptosis pada berbagai macam jenis sel. Meningkatnya produksi ROS akan mengakibatkan terjadinya kerusakan DNA (DNA damage) (Palackal *et al.*, 2002).

Kerusakan akibat stres oksidatif menimbulkan respon yang bermacam – macam, mulai dari proliferasi, penghentian pertumbuhan, penuaan, sampai kematian sel (Martindale, 2002).

Vitamin dan makanan yang kaya senyawa antioksidan bisa menjadi strategi yang efektif untuk mengurangi stres oksidatif dan gejala dan komplikasi yang terkait dengan wanita yang mengalami menopause (Sekhon and Agarwal, 2013). Konsumsi makanan kaya antioksidan dapat membantu dalam meningkatkan efek menguntungkan untuk pasien pascamenopause. Secara khusus, wanita yang tidak dapat mentoleransi efek samping yang merugikan dari terapi hormonal atau beresiko untuk kanker payudara, dan akan lebih aman untuk melakukan diet antioksidan guna mengontrol gejala menopause (Agarwal *et al.*, 2012). Antioksidan bekerja dengan mendonorkan satu elektronnya. Berinteraksi dengan menstabilkan radikal bebas sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif di dalam tubuh (Kumalaningsih, 2007).



Antosianin merupakan salah satu bioaktif dalam menangkal radikal bebas dan paling dikenal sebagai antioksidan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa selain sebagai antioksidan, antosianin juga mempunyai efek anti-inflamasi (Kumalaningsih, 2007; Giusti and Wrolstad, 2001). Antosianin dapat diperoleh dari buah dan sayur berwarna, antara lain ubi jalar ungu, strawberry, anggur merah, kubis merah, jagung merah, terong ungu, kedelai hitam dan banyak lainnya (Kumalaningsih, 2007).

Ubi jalar ungu yang merupakan salah satu sumber bahan pangan yang kaya antosianin, terdapat kandungan pigmen antosianin yang tinggi pada umbi ubi ungu. Antosianin dari ubi ungu lebih stabil dan menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas yang lebih kuat daripada pigmen lainnya seperti stroberi, kol merah, perilla, blueberries dan jagung merah. Banyak peneliti menunjukkan bahwa antosianin ubi jalar ungu memiliki banyak fungsi fisiologis (Kano *et al.*, 2005; Kumalaningsih, 2007; Philpott *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2001).

Penelitian tentang pengaruh antosianin terhadap organ reproduksi khususnya menopause masih sangat terbatas. Berikut ini beberapa penelitian yang telah dilakukan tentang efek pemberian antosianin terkait stres oksidatif. Penelitian oleh Aningsih (2016), tentang pengaruh pemberian antosianin ubi jalar ungu terhadap ovarium tikus putih betina yang dipapar asap rokok, membuktikan bahwa antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) varietas ungu dalam berbagai dosis (20, 40, 80 mg/ Kg BB/ hari) berpengaruh terhadap penurunan kadar MDA ovarium dan meningkatkan kadar 17β -estradiol. Semakin tinggi antosianin yang diberikan, semakin memberikan efek pada penurunan kadar MDA ovarium dan meningkatkan kadar 17β -estradiol. Kadar *Malondialdehid* (MDA) merupakan indikator dari peroksidasi lipid (Gurer-Orhan *et al.*, 2004).

Hasil penelitian idari Utami (2016), tentang pengaruh pengaruh antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) varietas ungu terhadap ketebalan endometrium pada



uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang dipapar asap rokok, menyebutkan bahwa pemberian antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) pada dosis 40 mg/KgBB dapat meningkatkan ketebalan endometrium tikus putih.

Penelitian Mok (2014) tentang pengaruh pemberian antosianin dari kulit kedelai hitam terhadap sel HLE (*human lens epithelial*), menunjukkan bahwa antosianin dari kulit kedelai hitam dapat melindungi sel HLE yang diinduksi H₂O₂ dari apoptosis dan menurunkan ekspresi Bad, Bax dan supresor tumor p53.

Penelitian Liu (2013) menunjukkan bahwa antosianin dari blueberry memiliki efek perlindungan pada sel yang rusak akibat penyinaran UV. Pemberian antosianin blueberry pada sel yang rusak akibat penyinaran UV dan disertai dengan peningkatan ekspresi protein p53, telah terbukti dapat menurunkan ekspresi protein p53. Berdasarkan fenomena di atas maka peneliti tertarik untuk mengetahui pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel, indeks apoptosis dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan masalah:

Apakah antosianin berpengaruh terhadap ketebalan epitel, indeks apoptosis dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi ?

Rumusan masalah tersebut dapat dibuat sub masalah sebagai berikut :

1. Apakah antosianin berpengaruh terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih ovariectomi?
2. Apakah antosianin berpengaruh terhadap indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih ovariectomi?
3. Apakah antosianin berpengaruh terhadap ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih ovariectomi?



4. Apakah terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih ovariektomi?
5. Apakah terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih ovariektomi?
6. Apakah antosianin melalui penurunan apoptosis sel epitel vagina atau melalui penurunan ekspresi p53 yang lebih berpengaruh terhadap ketebalan epitel vagina?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel, indeks apoptosis dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pengaruh antosianin terhadap epitel vagina tikus putih ovariektomi melalui pengukuran ketebalan epitel vagina.
2. Membuktikan pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih ovariektomi melalui penurunan indeks apoptosis sel epitel vagina.
3. Membuktikan pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih ovariektomi melalui penurunan ekspresi p53 sel epitel vagina.
4. Membuktikan korelasi antara ketebalan epitel vagina dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih ovariektomi.
5. Membuktikan korelasi antara ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih ovariektomi.



6. Membuktikan pengaruh antosianin melalui penurunan apoptosis sel epitel vagina atau melalui penurunan ekspresi p53 yang lebih dominan terhadap ketebalan epitel vagina.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Penambahan bahan alam ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) varietas ungu sebagai bahan untuk alternatif terapi terhadap keluhan menopause.
2. Bahan pengembangan dan penelitian selanjutnya tentang menopause.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Sebagai gambaran dalam pemberian asuhan kebidanan tentang manfaat ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) varietas ungu sebagai upaya preventif dalam pencegahan keluhan menopause dan resiko keganasan sel pada masa menopause.
2. Meningkatkan nilai produk ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) varietas ungu sebagai bahan herbal.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Menopause

2.1.1 Pengertian

Menopause diartikan sebagai haid yang terakhir, atau saat terjadinya haid terakhir. Sebelum haid berhenti, wanita akan mengalami siklus haid yang lebih panjang terlebih dahulu, dengan jumlah perdarahan yang lebih sedikit (berkurang) (Wiknjosastro, 2007). Menopause terjadi setelah periode amenorrea yang berlangsung lebih dari 1 tahun dan dimulai antara 40 dan 55 tahun (Scambia *et al.*, 2000). Masa transisi menopause biasanya dimulai pada pertengahan umur 40 tahun dan berlangsung sekitar 4 tahun, dimana menopause terjadi pada usia rata-rata 51 tahun (Randolph Jr *et al.*, 2004).

2.1.2 Tanda dan Gejala Menopause

Perempuan dalam transisi menopause umumnya mengalami berbagai gejala, antara lain :

1. Gejala vasomotor

Hot flushes adalah rasa panas yang datang secara tiba-tiba yang biasanya terjadi pada wajah, leher, dan dada disertai dengan keringat banyak (Gold *et al.*, 2000). *Hot flushes* nokturnal sering membangunkan wanita dari tidurnya dan dapat menyebabkan gangguan tidur yang berat atau insomnia (Heffner, 2010). Prevalensi *hot flushes* terjadi pada sekitar 65% wanita (Gold *et al.*, 2000). Teori yang umum tentang terjadinya *hot flushes* adalah penyempitan sistem termoregulasi (Freeman *et al.*, 2007). *Hot flushes* menggambarkan termoregulasi yang abnormal oleh hipotalamus anterior. Peran estrogen dalam patogenesis gejala ini belum jelas. Kadar estrogen endogen antara wanita



postmenopause yang mengalami *hot flashes* dan yang tidak mengalami tidak berbeda secara substansial (Randolph Jr et al., 2004).

2. Gejala pada vagina

Gejala yang terjadi pada vagina antara lain kekeringan, ketidaknyamanan, gatal, dan *dyspareunia*, dilaporkan oleh sekitar 30% wanita pada menopause dini dan sampai 47% wanita pada periode pascamenopause (Dennerstein et al., 2000). Penipisan pada epitel vagina dan kekeringan pada vagina akan menimbulkan *dyspareunia* (Al-Azzawi and Palacios, 2009).

3. Gangguan tidur dan insomnia

Kualitas tidur umumnya terganggu pada masa menopause. Dilaporkan bahwa masalah gangguan tidur dialami wanita saat mereka memasuki masa transisi menopause (Zheng et al., 2015). Gangguan kualitas tidur dikaitkan dengan perubahan hormonal yang berhubungan dengan masa transisi menopause.

Seiring waktu, laporan tentang gangguan tidur meningkat pada wanita postmenopause yaitu mencapai lebih dari 50% (Sherman, 2005).

4. Suasana hati yang buruk (perubahan mood)

Dalam sebuah penelitian, seperlima dari penduduk AS memiliki periode depresi dalam hidup mereka, dan hal ini terjadi dua kali lebih berpengaruh pada perempuan (Seedat et al., 2009). Faktor risikonya antara lain tidur yang buruk, stres, indeks massa tubuh yang tinggi, dan merokok. Selain itu, ada bukti bahwa perubahan hormonal yang terjadi selama menopause juga memainkan peranan, sebagaimana dibuktikan oleh peningkatan risiko depresi berkaitan dengan variabilitas kadar estradiol, meningkatkan tingkat FSH (*Follicle Stimulating Hormone*), menopause karena pembedahan, kehadiran *hot flashes*, dan riwayat sindrom pramenstruasi (Freeman, 2015).



5. Gejala akibat kelainan metabolik

Penurunan estrogen menyebabkan peningkatan kadar LDL (*Low-density lipoprotein*) dan menurunnya kadar HDL (*High-density lipoprotein*). Meliputi kelainan metabolisme lemak di hati (Proverawati, 2010).

6. Gejala kelainan metabolisme mineral

Gejala ini dapat menyebabkan wanita menopause mudah terjadi fraktur tulang, akibat dari tidak seimbangnya absorpsi dan resorpsi mineral terutama kalsium.

Bila hal ini berlangsung lama, dapat mengakibatkan osteoporosis (Proverawati, 2010).

7. Seks dan libido

Sering dijumpai gangguan seksual pada wanita seiring meningkatnya usia.

Aliran darah yang menuju ke vagina semakin berkurang, cairan vagina berkurang, dan sel-sel epitel vagina menjadi tipis dan mudah terluka, hal ini merupakan akibat dari kekurangan hormon estrogen, (Proverawati, 2010).

2.1.3 Fisiologi Menopause

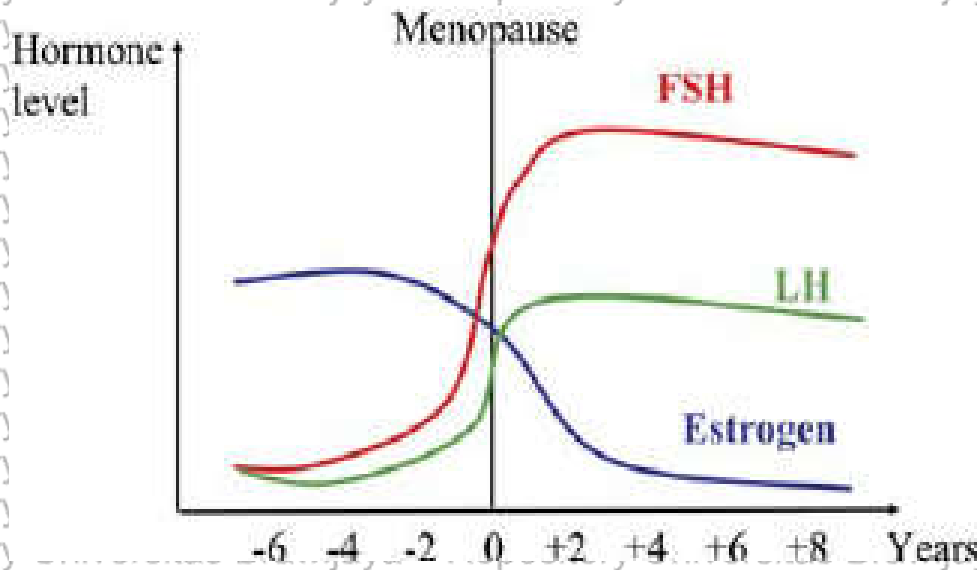
Menopause adalah bentuk penuaan dari reproduksi, penghentian permanen aktivitas folikel ovarium dan berakhirnya siklus menstruasi. Menopause merupakan proses alami dari tubuh, namun dapat juga akibat dari pembedahan (Mishra and Kuh, 2012). Menstruasi yang berhenti dan dapat disebabkan oleh

sistem syaraf pusat dan ovarium (Heffner, 2010). Ovarium tidak lagi menghasilkan estradiol atau progesteron tetapi terus memproduksi testosteron (Grady, 2006).

Fertilitas akan menurun secara drastis pada wanita saat memasuki usia 35 tahun dan akan lebih cepat lagi saat memasuki usia 40 tahun. Meskipun folikel-folikel masih terlihat melalui USG, namun usaha untuk menginduksi ovulasi buatan dengan menyuntikkan gonadotropin kemungkinan tidak akan berhasil bila



dilakukan setelah usia lebih dari 45 tahun (Heffner, 2010). Berikut ini adalah gambaran perubahan hormonal pada masa menopause:



Gambar 2.1 Perubahan Hormon pada Masa Menopause (Baron, 2006).

Pada masa menopause terjadi penurunan kadar hormon estrogen, sedangkan kadar hormone FSH dan LH meningkat tajam.

Selama menopause, penurunan produksi estrogen dan inhibin ovarium mengurangi sinyal umpan balik negatif terhadap hipofisis dan hipotalamus dan menyebabkan peningkatan yang progresif terhadap kadar gonadotropin. Karena inhibin bekerja khusus untuk meregulasi FSH, maka kadar FSH meningkat secara tidak proporsional terhadap kadar LH. Jika terdapat keraguan, maka peningkatan FSH serum yang menetap memastikan diagnosis menopause (Heffner, 2010).

Diagnosis menopause ditandai oleh peningkatan FSH > 40 IU / L (Kahwati *et al.*, 2005). Namun tes tersebut mahal dan menjadi alasan untuk memilih metode yang lebih hemat biaya, sederhana dan non-invasif (Caillouette *et al.*, 1997). Pemeriksaan pH vagina merupakan metode yang sederhana, akurat dan hemat biaya yang dapat digunakan sebagai alternatif yang cocok dalam mendiagnosis perubahan hormonal yang berhubungan dengan usia dan menopause (Panda *et al.*, 2014). Telah diketahui bahwa tanpa adanya infeksi vagina, pH vagina ≤ 4.5



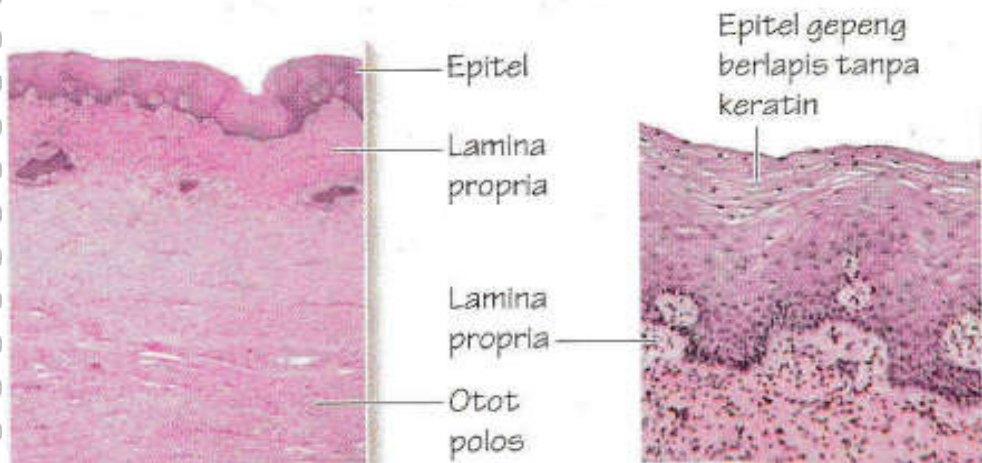
selama tahun-tahun reproduksi dan > 4,5 sebelum menarche dan setelah menopause (Yörük et al., 2006). Penelitian yang dilakukan Roy (2004) mengungkapkan bahwa wanita menopause yang tidak menerima terapi penggantian estrogen (ERT) memiliki nilai pH vagina 6,0.

Walaupun produksi estrogen ovarium berhenti saat menopause, wanita pasca menopause tidak sepenuhnya mengalami defisiensi estrogen. Jaringan perifer seperti lemak, hati, dan ginjal menghasilkan enzim aromatase dan dapat mengubah androgen yang ada bersirkulasi menjadi estrogen. Perbedaan utama antara estrogen yang langsung disekresi oleh ovarium dengan estrogen yang berasal dari konversi perifer adalah sebagian besar adalah estron. Estron merupakan estrogen yang dihasilkan dari aromatisasi androstenedion, suatu androgen utama yang disekresi ovarium pasca menopause dan kelenjar adrenal. Estron merupakan estrogen yang sangat lemah dibandingkan dengan estradiol. Estron tidak memberikan efek protektif terhadap efek jangka panjang defisiensi estrogen (hipoestrogen) (Heffner, 2010).

2.2 Vagina

2.2.1 Definisi

Vagina merupakan struktur tubular yang terbentang antara muaranya pada introitus perineum dengan servik. Permukaannya dibungkus oleh epitel dan ber-rugae (Heffner, 2010). Berikut ini gambaran struktur vagina :



Gambar 2.2 Struktur Vagina (Pekham, 2011).

Struktur vagina terdiri dari epitel, lamina propria, dan otot polos.

Vagina terdiri dari epitel berlapis tebal yang memiliki sifat protektif. Lapisan lamina propria merupakan lapisan yang kaya akan serat elastin dan tidak memiliki kelenjar apapun. Lapisan otot polos, merupakan lapisan yang memiliki lapisan sirkular dalam dan longitudinal luar, terletak dibawah lamina propria. Tunika adventesia luar bersatu dengan tunika adventesia kandung kemih (di anterior), dan rektum (di kandung kemih) (Pekham, 2011).

2.2.2 Epitel Vagina

Epitel vagina merupakan lapisan yang melapisi bagian dalam vagina yang terdiri dari sel epitel skuamosa kompleks tanpa kornifikasi (Gartner and Hiatt, 2012). Mukosa vagina yang sehat pada wanita usia reproduksi terdiri dari berlapis-lapis epitel skuamosa berlapis yang bertumpu pada lamina propria. Epitel mengalami diferensiasi dan mengandung beberapa lapisan yang berbeda atau strata: lapisan basal, lapisan superbasal, dan lapisan korneum (Bragulla and Homberger, 2009).

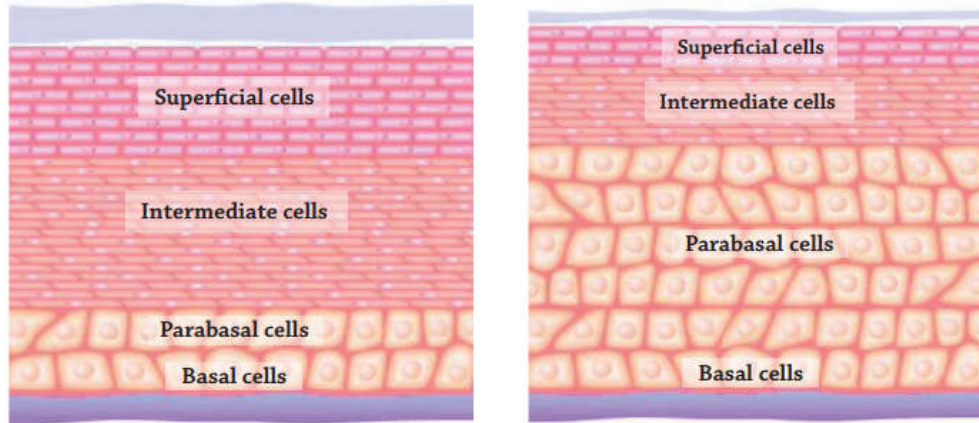


2.2.3 Epitel Vagina pada Masa Menopause

Estrogen merupakan hormone steroid alamiah yang disekresikan oleh sel teka interna folikel de Graaf dalam ovarium (Proverawati, 2010). Setelah menopause, biosintesis estrogen di ovarium berkurang sehingga sirkulasi estrogen terutama berasal dari aromatisasi perifer androgen adrenal. Estrogen paling kuat dan dominan adalah 17β -estradiol (E2) dalam kadar yang lebih rendah terdapat estron dan estriol (Björnström and Sjöberg, 2005; Lewis-Wambi and Jordan, 2009).

Salah satu fungsi hormon estrogen adalah menimbulkan proliferasi sel dan pertumbuhan jaringan pada organ – organ reproduksi (Guyton, 2000). Konsekuensi dari turunnya kadar estrogen yang dihasilkan akan menimbulkan efek fenotipik pada regenerasi dan perbaikan jaringan serta munculnya berbagai tanda-tanda dan gejala (Al-Azzawi and Palacios, 2009).

Epitel vagina mengalami perubahan pada sepanjang umur perempuan yang dipengaruhi oleh kondisi hormonal dan lingkungan. Pada anak perempuan muda sebelum pubertas, struktur epitel vagina tipis dan hanya terdiri dari lapisan basal dan lapisan parabasal (Patton *et al.*, 2000). Selama masa reproduksi, epitel vagina menebal dan terjadi perkembangan stratum korneum dan faktor hormonal hanya berpengaruh sedikit terhadap ketebalan epitel vagina (Patton *et al.*, 2000, Eschenbach *et al.*, 2000, Miller *et al.*, 2000). Setelah menopause epitel vagina menipis, glikogen berkurang dan stratum korneum menunjukkan derajat keratinisasi yang bervariasi (Thompson *et al.*, 2001, Zaino *et al.*, 2011).



Gambar 2.3 Perubahan Fisiologi pada Atrofi Vagina (Parks and Levine, 2015).

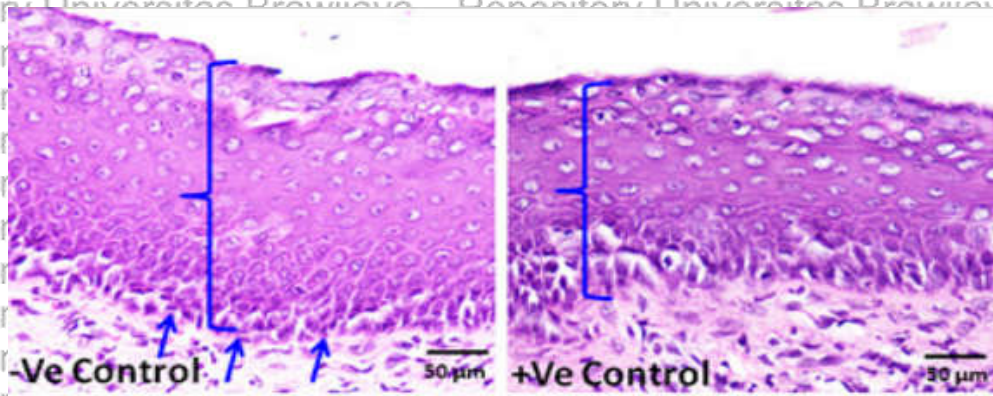
Pada masa premenopause (sebelah kiri) dan pada masa postmenopause (sebelah kanan).

Pada masa premenopause epitel vagina dalam keadaan sehat, lembab, dan tebal dengan lipatan-lipatan rugae. Estrogen berperan dalam mempertahankan ketebalan lapisan sel superfisial yang kaya akan glikogen yang mengatur *lactobacilli* penghasil asam, dan mempertahankan pH asam vagina. Sedangkan pada masa postmenopause terjadi atrofi pada epitel vagina, penurunan kadar estrogen menyebabkan hilangnya glikogen pada lapisan sel superfisial, dan menghilangnya *lactobacilli*. Elastisitas menurun, sehingga menyebabkan gejala seperti nyeri dan kekeringan, yang disertai dengan penurunan aliran darah vagina dan meningkatnya pH vagina. Atrofi vagina dapat ditegaskan dengan pemeriksaan vagina dengan tanda-tanda atrofi seperti, kekeringan vagina, *petechiae*, pucat, kerapuhan, elastisitas berkurang, kemerahan pada mukosa dan pH tinggi (Parks and Levine, 2015).

Menopause memiliki peranan dalam berkurangnya jumlah lapisan epitel vagina, dan hilangnya sel intermediate, yang ditunjukkan dengan berkurangnya tinggi epitel secara keseluruhan (Zaino and Robboy, 2002). Penelitian menunjukkan bahwa ovariectomi pada kelinci, tikus, dan primata (bukan manusia) memiliki pengaruh terhadap penurunan yang signifikan pada tinggi epitel vagina



dan jaringan otot polos (Zaino and Robboy, 2002, Park *et al.*, 2001, Sato *et al.*, 1997). Berikut ini gambaran perbandingan ketebalan epitel vagina pada tikus putih empat minggu setelah ovariectomi :



Gambar 2.4 Perbandingan Ketebalan Epitel Vagina Ovariectomi dan Tidak Ovariectomi (Abdel-Aal *et al.*, 2015).

Gambar pengamatan ketebalan epitel vagina tikus putih 4 minggu setelah ovariectomi yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Pada gambar 2.4 diatas, gambar sebelah kiri (kontrol negatif) merupakan gambar epitel vagina tikus putih betina yang tidak dilakukan ovariectomi.

Sedangkan pada gambar sebelah kanan (kontrol positif) merupakan gambar epitel vagina tikus putih yang dilakukan ovariectomi. Epitel vagina pada tikus yang diovariectomi mengalami penurunan jumlah lapisan sel epitel (Abdel-Aal *et al.*, 2015). Selain penurunan jumlah lapisan epitel, juga terjadi peningkatan fragmentasi DNA di vagina setelah ovariectomi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ovariectomi menginduksi apoptosis di vagina (Sato *et al.*, 2003).

2.3 Apoptosis

2.3.1 Pengertian Apoptosis

Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan suatu mekanisme kontrol yang mendorong sel mengalami kematian sebagai akibat kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki (Ghobrial *et al.*, 2005). Kematian sel atau apoptosis



adalah proses vital pada organisme multiselular yang biasanya terjadi selama perkembangan dan dikaitkan dengan pemeliharaan homeostasis sel, eliminasi sel yang rusak, respon terhadap agen infeksi, penuaan dan diferensiasi, serta respons adaptif sel terhadap biotik, dan tekanan abiotik (Danial and Korsmeyer, 2004; Green, 2005)

2.3.2 Fungsi Apoptosis

Kematian sel merupakan proses vital pada organisme multiselular yang biasanya terjadi selama perkembangan. Fungsi apoptosis antara lain :

1. Perkembangan Embrio

Peran pertama apoptosis adalah selama pengembangan intrauterine, yang berfungsi dalam pembentukan organ dan jari tangan dan kaki. Mekanisme apoptosis merupakan faktor penentu penting adanya kelainan janin (Norimura *et al.*, 1996). Pada masa perkembangan embrio terjadi proses pembelahan sel, diferensiasi sel dan berakhir dengan apoptosis. Sebagai contoh bila terjadi gangguan apoptosis berupa diferensiasi inkomplit pada pembelahan jari-jari maka bisa mengakibatkan jari-jari tidak terpisah (Lumongga, 2008). Apoptosis atau kematian sel terprogram (PCD) yang sangat teratur memainkan peran penting selama perkembangan normal, seperti pembuatan struktur otak dan penghapusan sel-sel non-fungsional dalam sistem kekebalan dewasa dan berkembang (Elmore, 2007).

2. Homeostasis

Apoptosis merupakan proses yang terjadi secara terus-menerus, diatur ketat untuk menjaga keseimbangan homeostatik seluler (Gavrilescu and Denkers, 2003). Proses homeostasis diperlukan untuk menyesuaikan dengan lingkungan internalnya. Proses ini bisa tercapai bila terjadi keseimbangan antara kecepatan mitosis dengan kematian sel. Bila keseimbangan ini



terganggu maka bisa berdampak negatif seperti munculnya tumor atau jumlah sel menjadi berkurang (Lumongga, 2008). Mekanisme apoptosis berfungsi untuk membersihkan sel-sel yang rusak (Martin *et al.*, 1998).

3. Terminasi Sel

Apoptosis, atau kematian sel terprogram (PCD), adalah respons fisiologis yang menghilangkan sel yang tidak diinginkan, proses evolusioner yang ada pada semua organisme multiseluler (Meier *et al.*, 2000). Apoptosis bisa terjadi karena infeksi virus, kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki akibat ionisasi, radiasi dan bahan kimia toksik. Pada keadaan ini keputusan untuk apoptosis berasal dari jaringan itu sendiri, sel yang ada di sekitarnya maupun sel yang terlibat dalam sistem imun yang bertujuan untuk mencegah sel menjadi lemah karena kekurangan nutrisi dan mencegah terjadinya penyebaran virus (Lumongga, 2008).

2.3.3 Mekanisme Apoptosis

Mekanisme apoptosis dibagi menjadi 4 tahap, yaitu :

1. Adanya signal kematian (penginduksi apoptosis)

Signal kematian yang dapat meginduksi apoptosis dapat berasal dari intrinsik maupun ekstrinsik. Signal dapat berupa radiasi, gangguan siklus sel, radikal bebas, faktor pertumbuhan dan sitokine (Taylor, 2008; Yoshimura, 1998; Rautureau, 2010, Kumar, 2010). Sinyal kematian sel intraseluler (intrinsik) seperti kerusakan DNA atau stres oksidatif, atau ekstraseluler (ekstrinsik) seperti hormon sitokin yang disebut faktor nekrosis tumor (Shen and Tower, 2009).

2. Tahap integrasi atau pengaturan

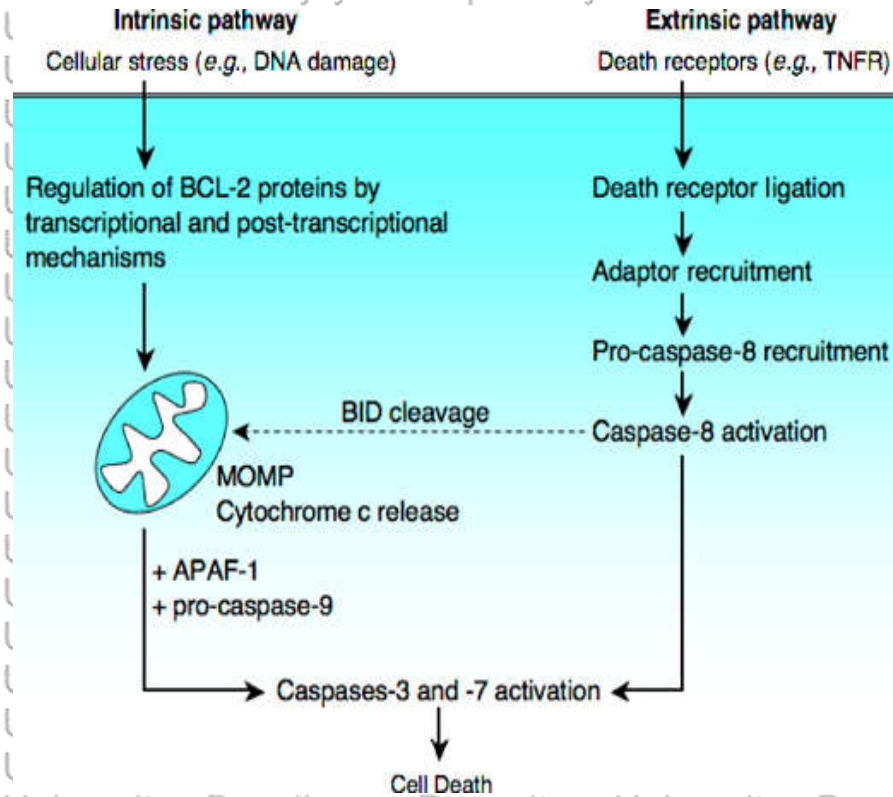
Apoptosis berpusat pada aktivasi proteolitik keluarga protease sistein yang dikenal sebagai caspases. Target caspase terdiri dari berbagai protein yang



terlibat dalam kelangsungan hidup sel, termasuk perbaikan DNA, kontrol siklus sel, dan pembentukan nuklear dan sitoskeletal, dan enzim ini juga menargetkan caspase di kaskade yang mengarah ke apoptosis. Caspases hadir sebagai proenzim dalam sel yang tidak distimulasi. Ada 14 caspase yang telah diketahui yang dibagi menjadi kelompok inisiator dan kelompok efektor (Nicholson, 1999). Inisiator caspase diaktifkan oleh dua mekanisme, yang pertama melibatkan ligasi reseptor permukaan sel (dari Casp-8), dan yang kedua adalah hasil stimulus internal yang tertekan (Casp-9). Casp-8 diaktifkan melalui reseptor membran sel CD95 (Fas/Apo1) (Juo *et al.*, 1998). Aktivasi Casp-9 melibatkan perubahan potensial membran mitokondria, yang menghasilkan translokasi sitokrom c dari membran mitokondria bagian dalam ke sitoplasma. Hilangnya potensi membran mitokondria bisa terjadi akibat dari induksi oleh zat beracun, kelebihan oksigen reaktif, stres yang disebabkan oleh iradiasi UV atau gamma, atau penurunan faktor pertumbuhan. (Green and Reed, 1998). Perubahan potensi membran mitokondria dan pelepasan sitokrom C ke dalam sitoplasma diatur dengan ketat oleh keluarga Bcl-2 protein yang bekerja dengan dimerisasi di membran mitokondria bagian luar. Beberapa protein ini bersifat antiapoptosis (Bcl-2 dan Bcl-XL), sedangkan yang lainnya bersifat proapoptosis (Bax dan Bad) (Adams and Cory, 2001).

3. Tahap pelaksanaan apoptosis

Signal apoptosis ini bisa terjadi melalui jalur intrinsik (*Mitochondrial Pathway*) dan jalur ekstrinsik (*Death Receptor*). Berikut ini gambaran berbagai jalur apoptosis :



Gambar 2.5 Apoptosis Jalur Intrinsik dan Jalur Ekstrinsik (Chipuk and Green, 2006).

Jalur intrinsiknya diinisiasi oleh tekanan seluler, seperti kerusakan DNA atau berkurangnya faktor pertumbuhan, dan berdampak langsung pada keluarga protein pro- dan anti-apoptosis Bcl-2. Jalur ekstrinsik memerlukan ligasi reseptor kematian oleh ligan kematian yang menghasilkan perakitan molekul adaptor dan aktivasi pro-caspase-8. Eksekutor caspase-3 dan -7 kemudian diaktifkan oleh caspase-8.

a. Apoptosis jalur intrinsik (jalur mitokondria)

Jalur intrinsik (diinduksi oleh tekanan seperti DNA kerusakan atau hipoksia) melibatkan oleh peraturan transkripsional atau posttranslasional protein Bcl-2 yang memiliki dampak langsung pada permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP) (Spierings *et al.*, 2005). MOMP terjadi melalui aksi anggota protein anti apoptosis (BCL-2, Bcl-XL) dan protein pro-apoptosis (Bax). Setelah MOMP terjadi, cytochrome c dilepaskan dari ruang intermembrane mitokondria, yang menyebabkan APAF1 (*apoptotic protease activating factor-1*) oligomerisasi dan menghasilkan



pembentukan apoptosom. Kompleks ini, pada gilirannya, merekrut dan mengaktifkan procaspase-9, yang kemudian mengaktifkan eksekutor caspases-3 dan 7. Caspases ini bertanggung jawab atas proses apoptosis, seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma dan blebbing (Muppidi *et al.*, 2004).

b. Apoptosis jalur ekstrinsik (*death receptor pathway*)

Apoptosis jalur ekstrinsik iinduksi oleh *Death reseptor* di permukaan sel (Muppidi *et al.*, 2004). Misalnya tumor nekrosis faktor (TNF) mengikat reseptor kematiannya TNFR1, yang menyebabkan perekrutan molekul adaptor, TRADD (*TNFR1-associated death domain*) dan FADD (*FAS-associated death domain*), dan pengikatan dan aktivasi procaspase-8 molekul yang dibawa bersama oleh TRADD dan FADD (Chipuk and Green, 2006). Ligan yang berikatan dengan death receptor yang terletak pada transmembran akan membentuk trimer yang disebut FADD. Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan FADD disebut DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kompleks ini akan mengaktifasi procaspase 8. Caspase 8 yang teraktivasi (heterotetramer) dilepaskan dari DISC ke sitoplasma. Caspase 8 termasuk caspase inisiator yang akan mengaktifasi caspase eksekutor terutama melalui pro-caspase 3 (Gewies, 2003).

Jalur ekstrinsik dan intrinsik keduanya berakhir pada fase eksekusi, yang dianggap sebagai tahap akhir apoptosis. Terjadi aktivasi caspases eksekutor. Caspases eksekutor mengaktifkan sitoplasma endonuclease (Slee *et al.*, 2001). Caspase-3 dianggap paling penting sebagai eksekutor dan diaktifkan oleh caspase inisiator (caspase-8, caspase-9, atau caspase-10). Caspase-3 secara khusus mengaktifkan CAD endonuklease. CAD dikomplekskan dengan inhibitorynya, ICAD. Pada sel apoptosis, caspase-3 yang diaktifkan membelah ICAD untuk melepaskan CAD (Sakahira *et al.*, 1998). CAD kemudian



menurunkan kromosom DNA di dalam nukleus dan menyebabkan kondensasi kromatin. Caspase-3 juga menginduksi reorganisasi sitoskeletal dan disintegrasi sel ke dalam badan apoptosis (Kataoka *et al.*, 1997).

4. Fagositosis

Fagositosis sel apoptosis adalah komponen terakhir dari apoptosis. Asimetri fosfolipid dan eksternalisasi fosfatidilserin pada permukaan sel apoptosis merupakan ciri khas fase ini (Bratton *et al.*, 1997). Badan apoptosis akan difagosit oleh sel yang berada disekitarnya. Adanya sel – sel fagosit ini dapat menjamin tidak menimbulkan respon inflamasi setelah terjadinya apoptosis (Gewies, 2003 ; Kumar *et al.*, 2010). Pada sel yang apoptosis tidak terjadi reaksi inflamasi, namun proses fagositosis yang terjadi akan memicu produksi sitokin anti inflamasi (Osthoff, 2008).

Sel yang apoptosis akibat dapat diselamatkan dari apoptosis jika stimulus apoptosis dilepaskan. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa perbaikan DNA yang diaktifkan sejak dini dapat menghindarkan dari proses apoptosis akibat p53 dan bahwa perbaikan DNA mungkin terjadi (Elmore, 2007).

2.4 Protein p53

2.4.1 Definisi

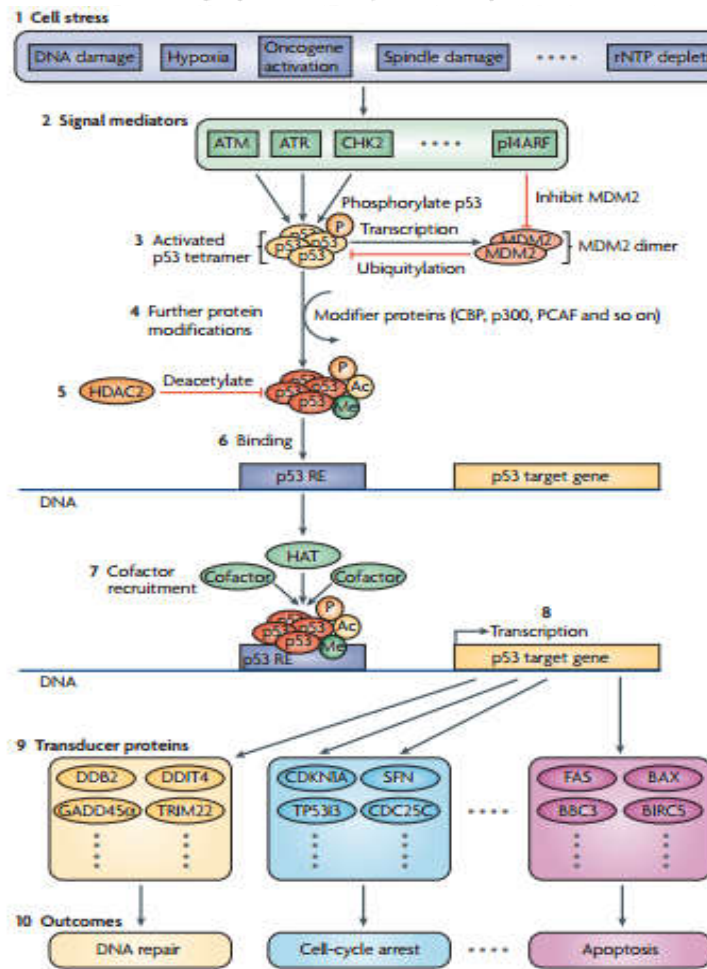
Protein p53 terletak di inti sel di seluruh tubuh, p53 mengikat langsung ke DNA. Bila DNA dalam sel rusak, p53 berperan penting dalam menentukan apakah DNA akan diperbaiki atau sel yang rusak akan mengalami apoptosis. Jika DNA bisa diperbaiki, p53 akan mengaktifkan protein yang lain untuk memperbaiki kerusakan. Jika DNA tidak bisa diperbaiki, protein ini akan menginduksi apoptosis sel, dengan menghentikan mutasi sel atau replikasi DNA yang rusak. p53 sangat penting untuk mengatur pembelahan sel dan mencegah pembentukan tumor sehingga diberi nama "*guardian of the genom*" (Genetics Home Reference, 2017).



Protein p53 merupakan protein yang berperan sebagai tumor suppressor dan sebagai regulator siklus sel. Protein p53 memegang peranan penting dalam adanya respon stres selular. Pada siklus sel, protein p53 merupakan salah satu *checkpoint* penting untuk mengenali sesuatu penyimpangan pada sel misalnya DNA yang telah rusak (Tan, 2000).

2.4.2 Aktivasi p53

Respon p53 ditimbulkan oleh berbagai macam stres seperti kerusakan DNA, aktivasi onkogen, mitosis abnormal, hilangnya kontak sel-sel dan hipoksia (Levine and Oren, 2009). Berikut ini gambaran aktivasi dari p53 :



Gambar 2.6 Mekanisme Aktivasi p53 (Riley, 2003).

Mekanisme aktivasi p53 yang diinduksi oleh sel yang mengalami stres.



Pada gambar diatas, adanya sel yang mengalami stres pada langkah pertama menimbulkan respon pada protein mediator sinyal untuk mengaktifkan p53 dengan memfosforilasi atau menghambat ubiquitilasi oleh MDM2 (*double minute-2*) pada langkah kedua. Pada langkah ketiga, kedua proses tersebut meningkatkan waktu paruh p53, dari menit ke jam, sehingga secara cepat meningkatkan ekspresi p53. Langkah ke lima, modifikasi p53 lebih lanjut oleh asetiltransferase (CBP, p300, PCAF) dan methyltransferases dapat menstabilkan protein p53 dan peningkatan lokasi spesifik DNA. Pada langkah kelima, HDAC2 dapat menghambat pengikatan p53 dengan DNA dengan protein deasetilasi. Langkah keenam, tetramer p53 berikatan dengan respons elemen (RE) p53 untuk mengatur transkripsi gen terdekat. Langkah ketujuh, p53 juga merekrut kofaktor seperti histone acetyltransferases (HATs). Pada langkah kedelapan, dalam contoh gambar diatas, p53 memediasi transkripsi gen targetnya, namun p53 juga bisa memediasi represl transkripsi. Pada langkah ke Sembilan, protein p53 mengaktifasi banyak gen dan produk protein yang terlibat dalam berbagai jalur. Pada langkah terakhir, jalur terpenting yang terlibat dalam penekanan tumor yang diaktifkan oleh p53 menginisiasi untuk perbaikan DNA, penghentian siklus sel, penuaan dan apoptosis (Riley, 2003).

Secara biokimia, p53 adalah pengatur transkripsi yang mampu mengendalikan ekspresi ratusan gen (Vousden and Prives, 2009, Levine and Oren, 2009). Dalam konteks ini, ia berinteraksi dengan banyak kofaktor dan ikatan yang memodulasi output transkripsionalnya. p53 terlibat dalam interaksi yang rumit dengan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) (Sablina, 2005).

Dalam kondisi sel yang normal tanpa stres, ekspresi p53 sangat rendah (Vogelstein *et al.*, 2000). Namun pada kondisi stres, p53 akan teraktivasi dan terjadi penghentian siklus sel dan perbaikan DNA atau apoptosis (Chene, 2003).

Dalam kondisi yang ringan (stres oksidatif yang fisiologis), p53 secara khusus

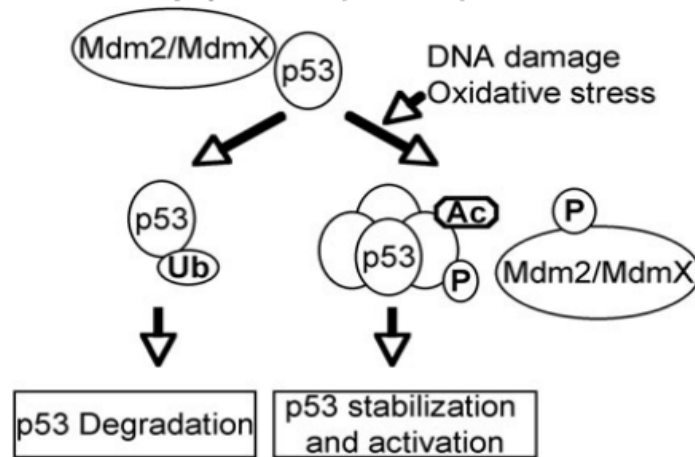


menginduksi ekspresi gen antioksidan. Ketika produksi ROS terjadi penyimpangan yang berat, p53 malah mengaktifkan gen pro-oksidan sehingga memfasilitasi adanya apoptosis, bersama dengan gen pro-apoptosis seperti PUMA dan Bax. Gen antioksidan yang diregulasi oleh p53 meliputi glutathione Peroksidase 1 (GPX1), mitokondria superoksida dismutase 2 (SOD2), aldehid dehidrogenase 4 anggota keluarga A1 (ALDH4A1) dan sestrin 1 dan 2 (SESN1 dan SESN2) (Sablina *et al.*, 2005).

Pada kondisi fisiologis (normal), p53 berperan dalam mengatur homeostatik pembentukan ROS dan proses metabolisme dengan cara mempertahankan metabolisme glukosa secara optimal dan menghasilkan energi di tingkat ATP (DeBerardinis *et al.*, 2008).

2.4.3 Peran p53 Sebagai Sensor Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah penginduksi utama penuaan secara fisiologis. p53 merupakan penjaga genom yang penting untuk respons seluler stres oksidatif, dan penuaan. Menanggapi rendahnya kadar stres oksidatif, p53 menunjukkan aktivitas antioksidan untuk menghilangkan stres oksidatif dan memastikan kelangsungan hidup sel, sebaliknya sebagai tanggapan terhadap stres oksidatif tingkat tinggi, p53 menunjukkan aktivitas pro-oksidatif yang selanjutnya dapat meningkatkan stres, dan menyebabkan kematian sel (Liu, 2011).



Gambar 2.7 Aktivasi p53 Dalam Menanggapi Kerusakan DNA dan Tekanan Oksidatif (Liu *et al.*, 2010).

Apabila tidak ada stres, regulator p53, seperti Mdm2/MdmX, menekan aktivitas p53 dan menginduksi degradasinya. Namun apabila menanggapi kerusakan DNA dan stres oksidatif, p53 dan regulatornya dimodifikasi secara *post translasional*, sehingga menyebabkan aktivasi p53.

ROS memiliki dampak yang signifikan pada pertumbuhan sel, kelangsungan hidup dan perkembangan, dan tumor (Chao *et al.*, 2003). p53 memainkan peranan penting dan kompleks dalam respon seluler terhadap stres oksidatif (Nakamizo *et al.*, 2008). Dalam menanggapi tingkat stres oksidatif yang rendah, p53 memainkan peran antioksidan. Sejumlah gen target p53, termasuk sestrin, *glutathion peroksidase* (GPX), dan *aldehida dehidrogenase* (ALDH), terlibat dalam mengurangi tekanan oksidatif (Budanov *et al.*, 2004).

Aktivasi ringan dan sementara p53 dalam menanggapi stres oksidatif tingkat rendah dapat berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Sebaliknya, aktivasi terus-menerus dari p53 dalam menanggapi tekanan oksidatif tingkat tinggi dapat mengakibatkan sel mengalami kematian dan penuaan organisme (Liu *et al.*, 2010).



2.5 Stres Oksidatif

2.5.1 Definisi Stres Oksidatif

Stres oksidatif merupakan suatu ketidakseimbangan reaksi pro-oksidan dan antioksidan (Dröge, 2002). Istilah stres oksidatif digunakan untuk menggambarkan kondisi kerusakan oksidatif yang terjadi ketika adanya ketidakseimbangan antara radikal bebas dan pertahanan antioksidan (Rock *et al.*, 1996).

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dalam orbital atom atau molekul (Halliwell and Gutteridge, 2015). Elektron yang tidak berpasangan ini biasanya memiliki tingkat reaktivitas yang cukup besar. Radikal yang berasal dari oksigen merupakan kategori yang paling penting dari kelompok radikal yang dihasilkan dalam sistem kehidupan (Miller *et al.*, 1990). Kelompok ini sangat reaktif, mampu merusak selaput sel dan merusak molekul biologis seperti DNA, protein, karbohidrat, dan lipid (Young, 2001). Radikal bebas menyerang makromolekul penting yang menyebabkan kerusakan sel dan gangguan homeostasis (Lobo *et al.*, 2010). Radikal bebas berasal dari proses metabolisme dalam tubuh manusia atau dari sumber luar. (Bagchi and Puri, 1998).

2.5.2 Mekanisme Stres Oksidatif

Stress oksidatif terjadi melalui terbentuknya ROS seperti hidroperoksida (HO_2), oksigen tunggal dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan yang kedua melalui terganggunya antioksidan dalam tubuh (Winarsi, 2007). Stres oksidatif dapat terjadi karena (1) berkurang atau tidak adanya antioksidan yang disebabkan oleh mutasi enzim yang berperan sebagai antioksidan seperti *Super Oxide Dismutase* (SOD) atau *Glutathione Peroxidase* (GPx) atau kurangnya diet antioksidan, (2) peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan atau *Reactive Nitrogen Species* (RNS), yang disebabkan oleh adanya paparan yang berlebihan terhadap oksigen

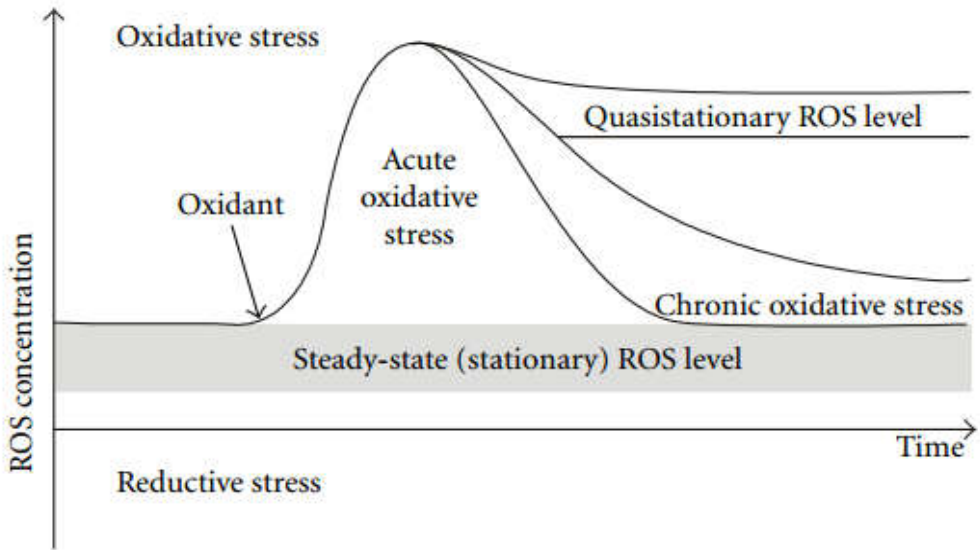


dalam tubuh dan adanya toksin yang metabolismenya menghasilkan ROS (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Reactive Oxygen species (ROS) adalah produk metabolisme sel normal. ROS dikenal dengan baik karena memainkan peran ganda sebagai spesies yang merusak maupun menguntungkan, karena bisa menjadi berbahaya atau bermanfaat bagi sistem kehidupan (Valko *et al.*, 2007). ROS dapat memberikan manfaat pada konsentrasi rendah seperti induksi respon mitogenik, sedangkan efek berbahaya dari radikal bebas adalah dapat menyebabkan kerusakan biologis potensial yang disebut stres oksidatif (Kovacic and Jacintho, 2001; Ridnour *et al.*, 2005).

Pada konsentrasi tinggi, ROS bisa menjadi mediator kerusakan struktur sel, asam nukleat, lipid dan protein. ROS yang berlebih dapat merusak lipid, protein, atau DNA dan menghambat fungsi normal mereka. Stres oksidatif merupakan awal dari semua penyakit dan proses penuaan. Oleh sebab itu, sangat penting untuk menjaga keseimbangan antara efek menguntungkan dan berbahaya dari radikal bebas yang merupakan aspek yang sangat penting dari kehidupan organisme (Dröge, 2002).

Stres oksidatif yang timbul sebagai akibat ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan pertahanan antioksidan, dikaitkan dengan kerusakan berbagai jenis molekuler termasuk lipid, protein, dan asam nukleat (McCord, 2000), sehingga muncul konsekuensi negatif potensial dari peningkatan produksi ROS baik secara akut maupun kronis. Jika sel tidak mampu mengatasi intensitas stres oksidatif, bisa berujung pada kematian sel melalui nekrosis atau apoptosis (Lushchak, 2011). Dinamika produksi ROS ditunjukkan pada gambar berikut :



Gambar 2.8 Dinamika Reactive Oxygen Species (ROS) dalam sistem biologis (Lushchak, 2012).

Kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berfluktuasi, dapat meningkat atau menurun di luar kisaran normal, dapat menghasilkan stres oksidatif akut atau kronis.

Di bawah kondisi kontrol, ROS berada pada posisi *steady state* atau seimbang, Namun, kondisi ini dapat berubah naik jika terjadi peningkatan produksi ROS baik sebagai hasil perubahan fisiologis internal atau dari induksi eksternal.

Jika potensi antioksidan selularnya cukup tinggi, maka keadaan ini bisa cepat diatasi dan dapat kembali ke keadaan seimbang. Tapi jika potensi antioksidan

yang ada tidak mampu mengeliminasi produksi ROS yang berlebih, maka sel akan meningkatkan pertahanan antioksidannya, tetapi akan membutuhkan waktu untuk

merespons, dan juga akan membutuhkan energi lebih besar. Peningkatan potensi antioksidan dapat mengembalikan kadar ROS pada kondisi normal, namun bila

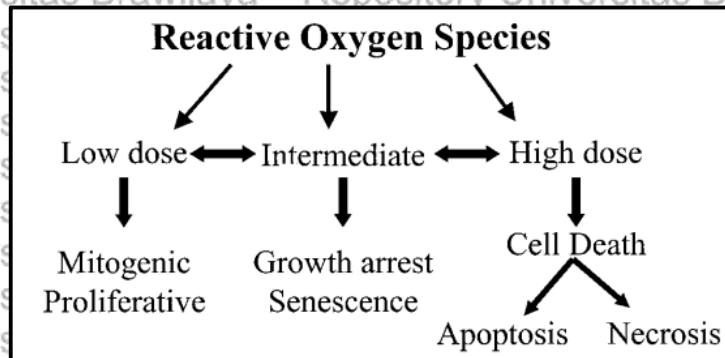
peningkatan kadar ROS terjadi berkepanjangan, maka akan terjadi stres oksidatif kronis pada sel. Dalam berbagai kasus, stres oksidatif akut tidak menimbulkan

konsekuensi serius, tapi keadaan kronis dapat menyebabkan patologi tertentu (Lushchak, 2012). Dalam kondisi tertentu, peningkatan ROS tidak kembali ke



keadaan semula dan disebut sebagai *quasistationary* yang terjadi pada berbagai keadaan patologis (Lushchak, 2011).

Pada tingkat sel, kerusakan akibat oksidan menimbulkan respon yang bermacam – macam, mulai dari proliferasi, penghentian pertumbuhan, penuaan, sampai kematian sel (Martindale and Holbrook, 2002). Dibawah ini gambar akibat dari peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS):



Gambar 2.9 Berbagai Macam Respon Akibat Reaktif Oxygen Species (ROS) (Martindale and Holbrook, 2002).

Respon yang terjadi tergantung pada tingkat keparahan kerusakan, yang selanjutnya dipengaruhi oleh jenis sel, besarnya dosis, lama pemaparan.

ROS dalam dosis rendah seperti hidrogen peroksida, memiliki sifat mitogenik dan meningkatkan proliferasi sel, sedangkan dosis menengah mengakibatkan penghentian pertumbuhan sementara atau permanen, seperti penuaan. Stres oksidatif yang parah akan menyebabkan kematian sel melalui apoptosis atau nekrosis (Martindale and Holbrook, 2002).

2.5.3 Stres Oksidatif Pada Menopause

Pada saat menopause penurunan kadar estrogen merupakan faktor yang mempengaruhi meningkatnya stres oksidatif (Ghosh *et al.*, 2009). Periode setelah menopause dapat dianggap sebagai awal dari proses penuaan pada wanita, yang disebabkan oleh serangkaian perubahan endokrinologis yang disebabkan oleh penurunan estradiol. Ketika wanita mulai mengalami penuaan ovarium, produksi



estradiol menjadi tidak menentu, perlindungan antioksidan hilang, dan terjadi peningkatan stres oksidatif (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan yang serius antara *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang diproduksi dan pertahanan dari sistem antioksidan. Ketika agen sitotoksik meningkat, kerusakan yang serius akan terjadi seperti pada lipid, protein, dan DNA (Finkel and Holbrook, 2000). Stres oksidatif berperan dalam proses penuaan dan merupakan hasil dari kelebihan produksi radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), yang mengancam pertahanan antioksidan di dalam tubuh (Agarwal *et al.*, 2012, Ruder *et al.*, 2008).

Pada saat menopause terjadi peningkatan stres oksidatif dikarenakan adanya penurunan kadar estrogen oksidatif (Ghosh *et al.*, 2009). Penurunan estrogen terbukti meningkatkan kadar stres oksidatif dalam tubuh, akan tetapi tergantung pada konsentrasinya. Pada konsentrasi rendah, hormon ini berperan sebagai prooksidan, terutama ketika struktur kimianya mengandung katekol (Wang *et al.*, 2010). Penurunan steroid ovarium karena menopause alami atau menopause karena pembedahan diketahui dapat menyebabkan perubahan struktural pada vagina dan dapat berkontribusi pada patofisiologi genital (Pessina, 2006).

Estrogen, terutama estradiol diketahui mampu memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif selama masa reproduksi. Selain itu, struktur kimia molekul estradiol memungkinkan mereka untuk bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas yang mencegah kerusakan oksidatif (Pansini *et al.*, 2005).

Pada konsentrasi tinggi, ROS bisa menyebabkan kerusakan struktur sel, asam nukleat, lipid dan protein (Valko *et al.*, 2007). Radikal hidroksil bereaksi dengan semua komponen molekul DNA kemudian merusak purin dan basa pirimidin. (Halliwell and Gutteridge, 2015). Radikal hidroksil dapat mengambil elektron dari PUFA dan akan menghasilkan lipid bebas. Lipid bebas yang bereaksi



dengan oksigen kemudian akan membentuk radikal bebas lipid. Jika radikal peroksi lipid tidak direduksi oleh suatu antioksidan maka akan terjadi proses peroksidasi lipid. Produk dari peroksidasi lipid adalah *Malonaldehyde* (MDA) dan pada akhirnya sel akan rusak serta mengalami kematian (Winarsi, 2007).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Setyarini (2015) tentang membuktikan adanya perbedaan kadar SOD, MDA dan ekspresi MAPK vagina *Rattus norvegicus* antara kelompok kontrol (-) atau yang tidak dilakukan ovariektomi dan kelompok kontrol (+) atau yang dilakukan ovariektomi. Kadar SOD, MDA dan ekspresi MAPK pada kelompok kontrol (+) meningkat secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol (-) atau yang tidak dilakukan ovariektomi. Winarsi (2007) menyebutkan bahwa tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim antioksidan (SOD) dan tingginya kadar *malondialdehid* (MDA) dalam plasma (Winarsi, 2007).

2.6 Antioksidan

2.6.1 Definisi Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga dapat mencegah kerusakan sel (Winarsi, 2007). Tubuh manusia memiliki beberapa mekanisme untuk mengatasi stres oksidatif dengan membentuk antioksidan, yang diproduksi secara alami (endogen) atau disuplai secara eksternal melalui makanan atau suplemen (eksogen). Antioksidan endogen dan eksogen berperan sebagai *scavenger* radikal bebas dengan cara mencegahnya dan memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh ROS, sehingga dapat meningkatkan pertahanan kekebalan tubuh dan menurunkan risiko penyakit (Valko et al., 2006; Chatterjee et al., 2007).



2.6.2 Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan dibagi menjadi 2, yaitu antioksidan yang diproduksi secara alami (Endogen) atau disuplai secara eksternal melalui makanan atau suplemen (eksogen) (Valko *et al.*, 2006). Senyawa antioksidan endogen dalam sel bisa diklasifikasikan sebagai antioksidan enzimatik dan non-enzimatik.

1. Antioksidan enzimatik

Antioksidan yang terlibat langsung dalam netralisasi ROS, antara lain :

superoksida dismutase (SOD), *katalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *Glutathione reductase* (GRx). SOD merupakan garis pertahanan pertama

melawan radikal bebas, mengkatalisis penurunan oksida anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan reduksi. Oksidan yang

terbentuk (H_2O_2) ditransformasikan menjadi air dan oksigen (O_2) dengan katalase (CAT) atau *glutathione peroxidase* (GPx) (Pacher *et al.*, 2007;

Halliwell, 2007)

2. Antioksidan non-enzimatik

Antioksidan non-enzimatik dibagi menjadi

a. Antioksidan metabolik

Antioksidan metabolik termasuk antioksidan endogen, diproduksi oleh

metabolisme dalam tubuh, seperti asam lemak, *glutathione*, *L-arginine*,

melatonin, asam urat, bilirubin, *transferrin*, dan lain – lain (Willcox *et al.*,

2004)

b. Antioksidan alami

Termasuk kedalam antioksidan eksogen, senyawa yang tidak dapat

diproduksi di dalam tubuh dan harus disediakan melalui makanan atau

suplemen, seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, selenium, mangan,

seng, flavonoid, omega-3 dan lemak lemak, omega-6, dan lainnya.

Antioksidan alami telah terbukti terlibat dalam detoksifikasi *Reactive*



Oxygen Spesies (ROS) (Gupta and Singh, 2013) dan memainkan peran penting dalam membantu antioksidan endogen untuk netralisasi stres oksidatif (Donaldson, 2004). Kekurangan antioksidan alami adalah salah satu penyebab banyaknya kasus penyakit patologi dan kanker yang kronis dan degeneratif (Willcox *et al.*, 2004).

2.6.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Fungsi dari kekebalan pada tingkat seluler sangat dipengaruhi oleh keseimbangan antioksidan dan oksidan, oleh karena itu tingkat antioksidan dalam sel ini memainkan peran penting dalam menjaga kekebalan dalam sel dan melindungi dari stres oksidatif. Antioksidan menjaga integritas dan fungsi membran lipid, protein seluler, dan asam nukleat dan kontrol sinyal transduksi dari kekebalan di dalam sel (Knight, 2000).

Ketika antioksidan menghancurkan radikal bebas, antioksidan itu sendiri akan menjadi teroksidasi. Oleh karena itu, sumber antioksidan harus terus dipulihkan di dalam tubuh. Jadi, meski dalam satu sistem tertentu, antioksidan efektif melawan radikal bebas; Di sistem lain, antioksidan yang sama bisa menjadi tidak efektif. Pada keadaan tertentu, antioksidan bahkan bisa bertindak pro-oksidan, misalnya, bisa menghasilkan ROS (Young dan Woodside, 2001).

Proses antioksidan dapat berfungsi dalam salah satu dari dua cara: pemutusan rantai atau pencegahan. Untuk proses pemutusan rantai, bila radikal melepaskan atau mencuri elektron, maka akan dibentuk radikal kedua. Untuk yang preventif atau pencegahan, enzim antioksidan seperti *Superoksida Dismutase* (SOD), Katalase, dan *glutathione peroxidase* dapat mencegah oksidasi dengan mengurangi pembentukan rantai radikal bebas (Young and Woodside, 2001).



2.7 Flavonoid

Flavonoid (istilahnya berasal dari kata Latin "Flavus" yang berarti kuning, merupakan tanaman yang dikenal dengan karakteristik merah, biru, dan pigmen antosianin ungu (Winkel-Shirley, 2001). Flavonoid adalah kelas dari fenol dengan sifat antioksidan yang signifikan. Flavonoid pada makanan adalah sebagai glikosida dan polimer yang terdegradasi dalam saluran pencernaan. Penyerapan enterik flavonoid cukup untuk mengurangi indeks oksidan. Kecenderungan flavonoid untuk menghambat mediasi radikal bebas diatur oleh struktur kimianya (Heim *et al.*, 2002). Menurut beberapa penelitian kapasitas antioksidan flavonoid lebih banyak dan lebih kuat daripada vitamin C dan E. Penelitian menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan dalam plasma pada manusia dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsumsi flavonoid yang berasal dari buah dan sayuran.

Beberapa flavonoid memiliki efek kemopreventif terhadap berbagai jenis kanker pada banyak model hewan. Flavonoid berperan sebagai *scavenger* radikal bebas, flavonoid mengandung gugus hidroksil dan bersifat sebagai reduktor, flavonoid mendonorkan hydrogen kepada radikal bebas. Flavonoid terbagi dalam beberapa jenis :

1. Flavon
2. Isoflavon
3. Flavanon
4. Flavanol
5. Cathecin
6. Antosianin
7. Proantosianidin

(Prior and Cao, 2000)



2.8 Antosianin

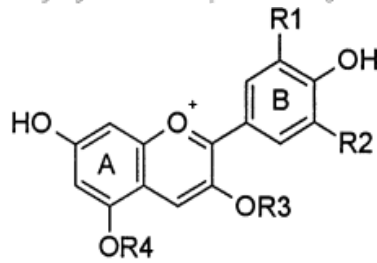
2.8.1 Definisi Antosianin

Antosianin adalah salah satu bioaktif untuk menangkal radikal bebas (Kumalaningsih, 2007). Antosianin merupakan salah satu anggota kelas flavonoid (Satué-Gracia *et al.*, 1997). Dan merupakan suatu pigmen alami yang dapat menghasilkan warna antara lain biru, ungu, violet, magenta dan kuning. Pigmen ini larut dalam air yang terdapat pada bunga, buah dan daun tumbuhan (Santoso dan Estiasih, 2014). Antosianin merupakan polifenol golongan flavonoid yang mempunyai struktur dan jalur biosintesis mirip dengan golongan flavonoid lain yaitu isoflavan dan flavanon (Schmitt, 2001).

2.8.2 Struktur Kimia

Antosianidin adalah struktur dasar antosianin. Antosianidin (aglikon) terdiri dari cincin aromatik (A) yang terikat pada cincin heterosiklik (C) yang mengandung oksigen, yang juga diikat oleh ikatan karbon ke cincin aromatik ketiga (B) (Konczak and Zhang, 2004). Antosianin yang banyak ditemukan adalah cyanidin, delphinidin, pelargonidin yang biasanya berikatan dengan senyawa sakarida seperti glukosa, galaktosa, rhamnosa atau arabinosa, dalam bentuk 3-glikosida atau 3,5-diglikosida. Perbedaan warna antara antosianin biasanya karena perbedaan pola cincin B antosianidin, pola glukosilasi dan derajat esterifikasi glukosa dengan asam alifatik atau aromatik, dan pH, suhu, jenis pelarut dan adanya pigmen penyerta (Shipp and Abdel-Aal, 2010).

Bentuk aglikon yang telah diketahui adalah antosianidin, sianidin, delphinidin, peonidin, petunidin, malvidin, dan pelargonidin. Mereka semua memiliki struktur kationik flavylum dasar pada pH rendah, dan berbeda satu sama lain dengan memiliki perbedaan substituen pada cincin B. Berikut ini adalah gambar struktur antosianin:



Antocyanidin	R1	R2
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Gambar 2.10 Rumus Struktur Antosianin (Prior and Cao, 2000).

Semakin banyak substitusi OH akan menyebabkan warna semakin biru, sedangkan metoksilasi menyebabkan warna semakin merah.

Struktur antosianin yang terkonjugasi memungkinkan delokalisasi elektron yang menghasilkan produk radikal yang sangat stabil yang menguntungkan, mengingat kemampuan antioxidant. Posisi hidroksilasi dan metoksilasi pada cincin B mempengaruhi stabilitas dan reaktivitas dan juga aktivitas antioksidannya (Kähkönen and Heinonen, 2003).

2.8.3 Efek Fisiologis

Antosianin dapat berperan sebagai *scavenger* yang bisa menangkap radikal bebas, kemampuan ini ditentukan oleh gugus OH pada struktur aglikonnya.

Antosianin memiliki gugus OH yang lebih banyak dibandingkan dengan pelargonidin, malvidin, dan peonidin yang hanya memiliki 1 gugus OH, sehingga kemampuan antioksidannya lebih lemah daripada antosianin yang memiliki sifat antioksidan lebih kuat (Shipp and El-Sayed, 2010). Terlepas dari efek pewarnaannya pada buah-buahan, antosianin menunjukkan kemampuan untuk



mencegah oksidasi lipid (Satué-Gracia et al., 1997) dan aktivitas melawan berbagai radikal bebas (Kahkonen, 2002).

Pada beberapa tahun terakhir, ketertarikan peneliti terhadap antosianin meningkat, mengingat banyak manfaat yang dapat diperoleh dibidang kesehatan (Guisti and Wolstadt, 2003). Antosianin dapat memberikan perlindungan dari pembelahan DNA, penghambatan enzim, meningkatkan produksi sitokin (dengan demikian mengatur respons kekebalan tubuh), aktivitas antiinflamasi, peroksidasi lipid, menurunkan permeabilitas kapiler dan kerapuhan, dan penguatan membran sel (Lila, 2004).

Penelitian menunjukkan bahwa anthocianin dari blueberry memiliki efek perlindungan pada sel yang rusak akibat penyinaran UV, terkait dengan aktivitas antioksidannya. DNA rusak secara signifikan setelah penyinaran UV, disertai dengan peningkatan ekspresi protein p53 dan p21. Sebaliknya, sel yang telah diberikan antosianin dari blueberry, telah terbukti dapat menurunkan ekspresi protein p53 dan p21. Hal ini membuktikan bahwa bahwa antosianin dari blueberry dapat mempengaruhi mekanisme perbaikan DNA (Liu et al., 2013).

Kerusakan oksidatif pada DNA sering menyebabkan mutasi gen dan berpotensi dalam timbulnya karsinogenesis. Perbaikan pada kerusakan DNA adalah proses yang sederhana, namun perbaikan pada kerusakan DNA yang ekstensif memerlukan seperangkat kontrol molekuler yang kompleks pada sel.

Checkpoint siklus sel pada replikasi DNA dan jaringan kompleks protein sensor akan memastikan bahwa DNA dalam keadaan baik (Nyberg et al., 2002, Kim et al., 2011).

Antosianin dapat melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh stres oksidatif. Antosianin meningkatkan ekspresi Bcl-2 (protein anti apoptosis), di sisi lain antosianin dapat menurunkan ekspresi Bad dan Bax, anggota keluarga protein BCL-2 yang pro-apoptosis dan juga mengurangi atau menekan ekspresi p53, dan



caspase-3, yaitu protease yang terkait dengan aktivasi kematian sel. Antosianin menekan apoptosis pada jalur ekstrinsik yang diinduksi oleh stres oksidatif (Mok, 2014).

2.8.4 Bioavailabilitas

Setelah menelan, antosianin mudah terdeteksi dalam plasma, kemungkinan akibat penyerapannya melalui dinding lambung (Fernandes *et al.*, 2014). Hasil penelitian secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba tikus, antosianin dapat mencapai plasma setelah 6 menit dan dapat menembus mukosa lambung (Passamonti *et al.*, 2003). Penelitian lain menyebutkan bahwa antosianin glikosida diserap oleh usus halus secara cepat, dimetabolisme dan diekskresikan ke dalam empedu dan urin sebagai glikosida utuh serta bentuk termetilasi dan turunannya (Talavera *et al.*, 2004). Sedangkan untuk proses ekskresi antosianin, terjadi dalam waktu 6-8 jam dimana ditemukan kurang dari 0,1% antosianin terdeteksi di urine (Shipp and Abdel-Aal, 2010).

2.8.5 Antosianin Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.)

Antosianin dapat diperoleh dari buah dan sayur berwarna, antara lain ubi jalar ungu, strawberry, anggur merah, kubis merah, jagung merah, terong ungu, kedelai hitam dan banyak lainnya. Ubi jalar ungu yang merupakan salah satu sumber bahan pangan yang kaya antosianin, memiliki pigmen yang lebih stabil bila dibandingkan dengan anthosianin dari sumber lain seperti kubis merah, blueberries dan jagung merah (Kumalaningsih, 2006). Ubi jalar ungu mengandung antosianin terutama peonidins dan cyanidins yang memiliki sifat penting sebagai antioksidan dan anti-inflamasi (Ishida *et al.*, 2000). Hwang (2010), antosianin dari ubi jalar varietas ungu dapat meningkatkan ekspresi enzim antioksidan. Demikian



juga dengan Zhao (2013), menyebutkan bahwa efek antioksidan pada ekstrak antosianin ubi jalar varietas ungu lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin C.

2.9 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih dengan nama ilmiah *Rattus norvegicus*. Tikus yang banyak digunakan sebagai hewan percobaan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hewan percobaan ini memiliki beberapa keunggulan yaitu penanganan dan pemeliharannya mudah, biaya yang dibutuhkan tidak mahal, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia besar, lama kebuntingan singkat, angka kelahiran tinggi, siklus estrus pendek dan karakteristik setiap fase siklus jelas (Nursyah, 2012).



Gambar 2.12 *Rattus norvegicus*

Klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
 Fillum : Chordata
 Sub fillum : Vertebrata
 Kelas : Mamalia



Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : *Rattus Novergicus*

(Hedrich, 2006)

Data biologis hewan coba *Rattus Novergicus* :

Berat badan dewasa : 180 – 220 gr (betina)

Rentang usia : 2 – 4 tahun

Usia produksi : 8 – 10 minggu

Konsumsi makanan : 15 – 30 g / hari (dewasa)

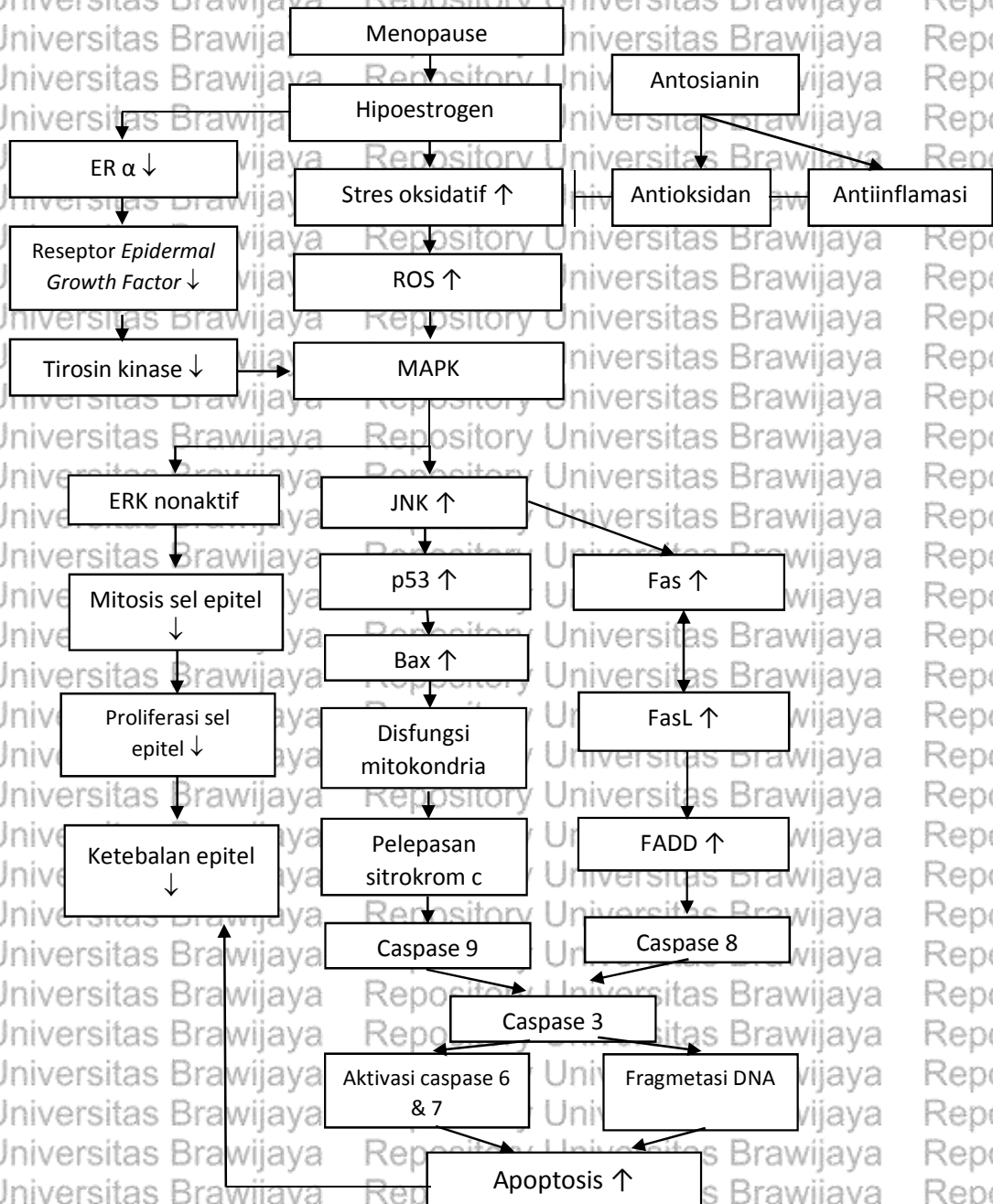
Konsumsi air : 20 – 45 ml/hari (dewasa)

Temperatur yang cocok untuk habitat tikus yang juga tergolong dalam hewan nokturnal ini adalah 19°C hingga 23°C dengan kelembaban 40 – 70% (Wolfenshon and Lloyd, 2013). Tikus di dalam laboratorium diberikan makanan dan air minum secara *adlibitum* kandang pemeliharaan dijaga kebersihannya serta disesuaikan dengan kondisi alamnya (Hubrecht and Kirkwood, 2010).



BAB 3
KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka Teori Pengaruh Antiosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Ovariektomi.

**Penjelasan :**

Menopause merupakan suatu fenomena fisiologis yang berkaitan dengan berhenti berfungsinya ovarium dan juga siklus menstruasi (Doshi and Agarwal, 2013). Salah satu organ yang mengalami dampak akibat terjadinya hipoestrogen adalah vagina. Manifestasi umum dari penurunan estrogen setelah menopause adalah atrofi vagina (Al-Baghdadi and Ewies, 2009). Pada masa menopause jumlah lapisan epitel vagina menjadi berkurang, dan sel *intermediate* menghilang, yang ditunjukkan dengan berkurangnya tinggi epitel secara keseluruhan (Zaino and Robboy, 2002).

Turunnya kadar estrogen menyebabkan tidak adanya interaksi antara estrogen dengan reseptor estrogen (Puspitadewi, 2007). Pada kondisi hipoestrogen, *epidermal growth factor* (EGF) yang merupakan protein kinase yang terdapat pada epitel dalam kondisi tidak aktif. EGF dan tiroksin kinase tidak dapat mengaktifkan protein kinase dalam sitoplasma sel berupa *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang merupakan sinyal utama pengaktivasi transkripsi dan translasi (Kusmana *et al.*, 2010). MAPK mengaktifkan *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) yang berfungsi dalam mengendalikan pembelahan sel (Johnson, 2002). Jika ERK tidak aktif maka tidak terjadi sintesa protein yang diperlukan untuk mitosis sel - sel epitel. Jika tidak terjadi mitosis pada sel epitel, maka tidak akan terjadi proliferasi sel epitel dan menyebabkan sel epitel vagina menjadi tipis (Kusmana *et al.*, 2010). Atrofi organ biasanya melibatkan kombinasi atrofi seluler dan penurunan jumlah sel. Salah satu cara penyebab penurunan jumlah sel adalah melalui apoptosis, atau kematian sel terprogram.

Pada saat menopause, estrogen mengalami penurunan atau hipoestrogen dan menyebabkan stres oksidatif karena adanya produksi ROS (Doshi and Agarwal, 2013). *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyebabkan peroksidasi



lipid, oksidasi pada protein, kerusakan pada asam nukleat, penghambatan enzim, dan aktivasi dari jalur apoptosis, dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Chang and Chuang, 2010)

ROS terlibat dalam aktivasi JNK dan akumulasi p53 (Yang *et al.*, 2017).

JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) merupakan anggota jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs), yang memainkan peran penting dalam apoptosis jalur ekstrinsik dan intrinsik (Pitzschke and Hirt, 2006). Stres oksidatif dapat mengaktifkan respon p53 (Levine and Oren, 2009). Bila DNA dalam sel rusak, p53 berperan penting dalam menentukan apakah DNA akan diperbaiki atau sel yang rusak akan mengalami apoptosis (Genetics Home Reference, 2017).

Protein penekan tumor p53 adalah sensor universal dari tekanan genotoksik dan, sebagai faktor transkripsi, yang memainkan peran penting dalam mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam menengahi penahanan pertumbuhan dan / atau kematian sel. ROS terlibat dalam berbagai tingkatan dalam sinyal p53. ROS adalah aktivator p53 yang potensial. P53 dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dimana pada kondisi stres oksidatif yang meningkat, p53 mengaktifkan Bax (protein pro apoptosis) (Mok, 2014).

Aktivasi caspase oleh p53 terjadi melalui pelepasan faktor apoptogenik dari mitokondria, termasuk sitokrom c. Pelepasan sitokrom c memungkinkan pembentukan apoptosom, yang terdiri dari protein adaptor Apaf-1 dan caspase 9. Caspase aktif 9 kemudian membelah dan mengaktifkan caspases efektor, seperti caspases-3 dan juga mengaktifkan caspase eksekutor seperti caspase 6 dan 7 yang mengeksekusi program kematian (Muppidi *et al.*, 2004; Schuler and Green, 2001).

Apoptosis jalur ekstrinsik induksi oleh *death reseptor* di permukaan sel (Muppidi *et al.*, 2004). Salah satu anggota keluarga reseptor faktor nekrosis tumor (TNFR) Fas (juga dikenal sebagai CD95 atau Apo-1), bisa memicu kematian sel



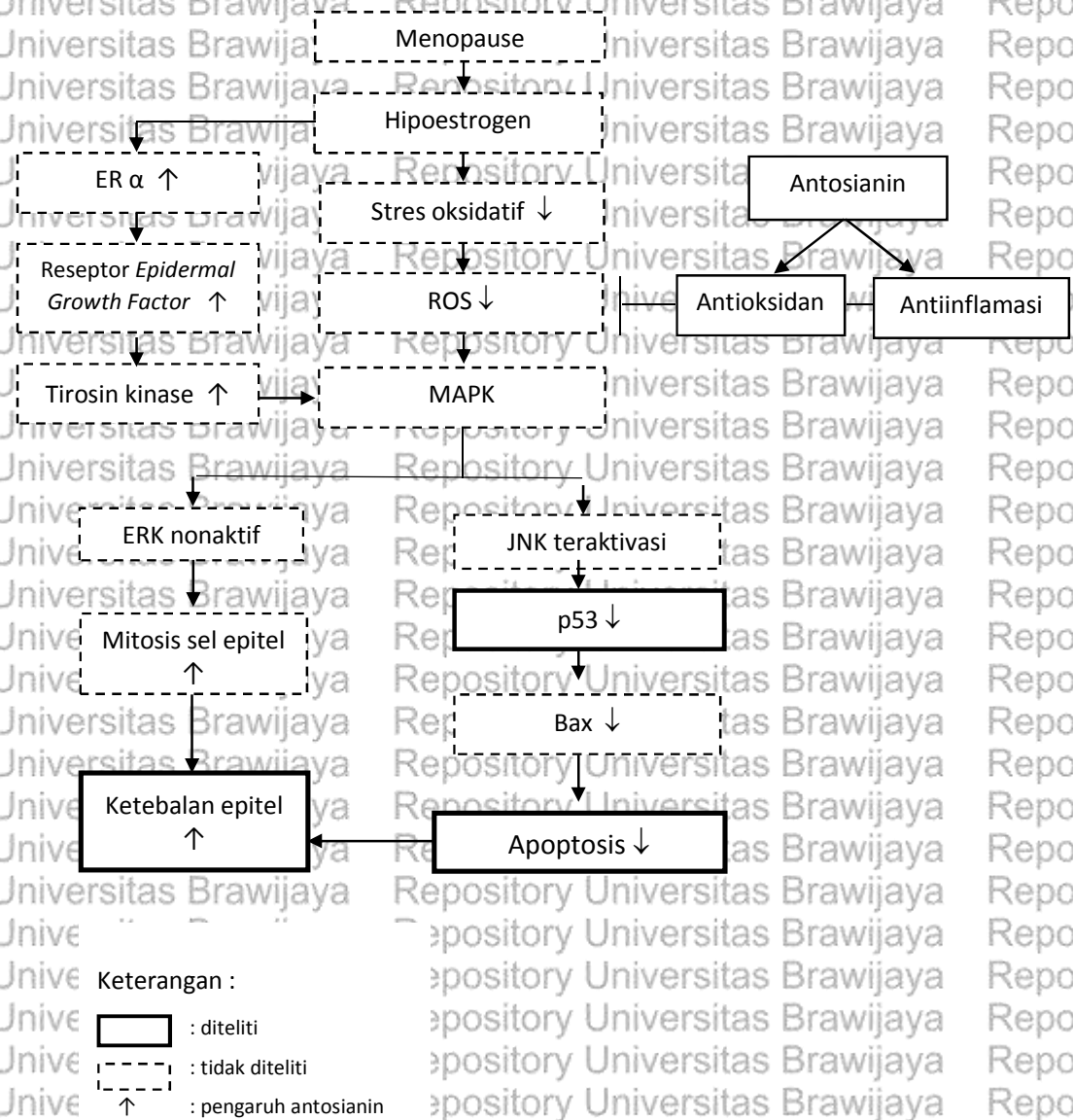
(Zhang *et al.*, 1998). Pada jalur ekstrinsik tumor nekrosis faktor (TNF) mengikat reseptor kematiannya TNFR1, yang menyebabkan perekrutan molekul adaptor, TRADD (TNFR1-associated death domain) dan FADD (FAS-associated death domain), dan pengikatan dan aktivasi procaspase-8 molekul yang dibawa bersama oleh TRADD dan FADD (Chipuk and Green, 2006). Ligan yang berikatan dengan death receptor yang terletak pada transmembran akan membentuk trimer yang disebut FADD. Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan FADD disebut DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kompleks ini akan mengaktivasi procaspase 8. Caspase 8 yang teraktivasi (heterotetramer) dilepaskan dari DISC ke sitoplasma. Caspase 8 termasuk caspase inisiator yang akan mengaktivasi caspase eksekutor terutama melalui pro-caspase 3 (Gewies, 2003).

Antioksidan berperan untuk menetralkan ROS, dengan demikian membantu untuk mencegah stres oksidatif (Agarwal *et al.*, 2012; Agarwal and Allamaneni, 2004). Antioksidan bekerja dengan memberikan satu elektronnya. Antioksidan berinteraksi dengan menstabilkan radikal bebas sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif didalam tubuh (Kumalaningsih, 2007).

Antosianin merupakan salah satu bioaktif yang memiliki fungsi untuk menangkal radikal bebas (Kumalaningsih, 2007). Antosianin dikenal sebagai antioksidan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa antosianin juga mempunyai efek anti-inflamasi selain sebagai antioksidan (Wolstad, 2001). Antosianin dapat memberikan perlindungan dari pembelahan DNA, penghambatan enzim, meningkatkan produksi sitokin (dengan demikian mengatur respons kekebalan tubuh), aktivitas antiinflamasi, peroksidasi lipiddan penguatan membran sel (Lila, 2004).



3.2 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Ovariektomi.



3.2 Hipotesis

1. Antosianin dapat meningkatkan ketebalan sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ovariektomi.
2. Antosianin dapat menurunkan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ovariektomi.
3. Antosianin dapat menurunkan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ovariektomi.
4. Terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ovariektomi.
5. Terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus novergicus*) ovariektomi.
6. Antosianin lebih berpengaruh terhadap ketebalan epitel vagina melalui penurunan apoptosis sel epitel vagina daripada melalui penurunan ekspresi p53.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah *True Experimental laboratory*, dengan menggunakan pendekatan *posttest only group control design*. Penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan pada hewan coba, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar. Penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol yang dilakukan ovariektomi tetapi tidak diberikan antosianin dan 3 kelompok perlakuan yang diberikan antosianin dengan dosis yang berbeda. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel, indeks apoptosis dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, ovariektomi dan pemberian antosianin, Laboratorium Fisiologi untuk pengenceran antosianin, Laboratorium Patologi Anatomi untuk pembuatan preparat dan pengukuran ketebalan sel epitel vagina, serta Laboratoum Biokimia untuk pemeriksaan ekspresi p53 dan indeks apoptosis. Waktu pelaksanaan penelitian adalah Mei - Juli 2017.



4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur wistar yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Alasan penggunaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) dalam penelitian ini karena hewan ini lebih tahan terhadap perlakuan ovariektomi serta mempunyai ukuran tubuh tidak terlalu kecil dan tidak dapat memuntahkan kembali isi perutnya (Putra, 2009; Kusumawati, 2004).

4.3.2 Kriteria sampel

Kriteria sampel dalam penelitian ini antara lain :

1. Kriteria inklusi

- a. Jenis kelamin betina
- b. Berat badan 150 – 200 gram
- c. Tikus sehat (aktif bergerak, tidak cacat, dan tidak ditemukan luka di tubuh).

2. Kriteria eksklusi

- a. Tikus dalam keadaan bunting
- b. Tikus sakit

3. Kriteria drop out

Tikus putih yang mati selama penelitian berlangsung.

4.3.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Tikus yang sesuai dengan kriteria inklusi dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, dimana masing – masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Penetapan jumlah kelompok berdasarkan



perbedaan dosis perlakuan. Pembagian kelompok tikus dilakukan dengan cara acak (*simple randomized sampling*). Pembagian kelompok sebagai berikut :

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok penelitian

Kelompok	Peran	Keterangan
K	Kontrol	- Dilakukan ovariectomi - Tidak diberikan antosianin
P1	Perlakuan 1	- Dilakukan ovariectomi - Diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr
P2	Perlakuan 2	- Dilakukan ovariectomi - Diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/ KgBB/hr
P3	Perlakuan 3	- Dilakukan ovariectomi - Diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/ KgBB/hr

Jumlah sampel untuk masing – masing kelompok adalah 6 ekor. Jadi total penggunaan hewan coba pada penelitian ini adalah 24 ekor. Jumlah sampel berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina sebagai hewan percobaan (Khusniyati, 2014; Setyaningrum, 2016).

4.4 Variabel Penelitian

1. Variabel independen : pemberian antosianin dengan berbagai dosis.
2. Variabel dependen : ketebalan sel epitel vagina.
3. Variabel antara : ekspresi p53 dan indeks apoptosis sel epitel vagina



4.5 Definisi operasional

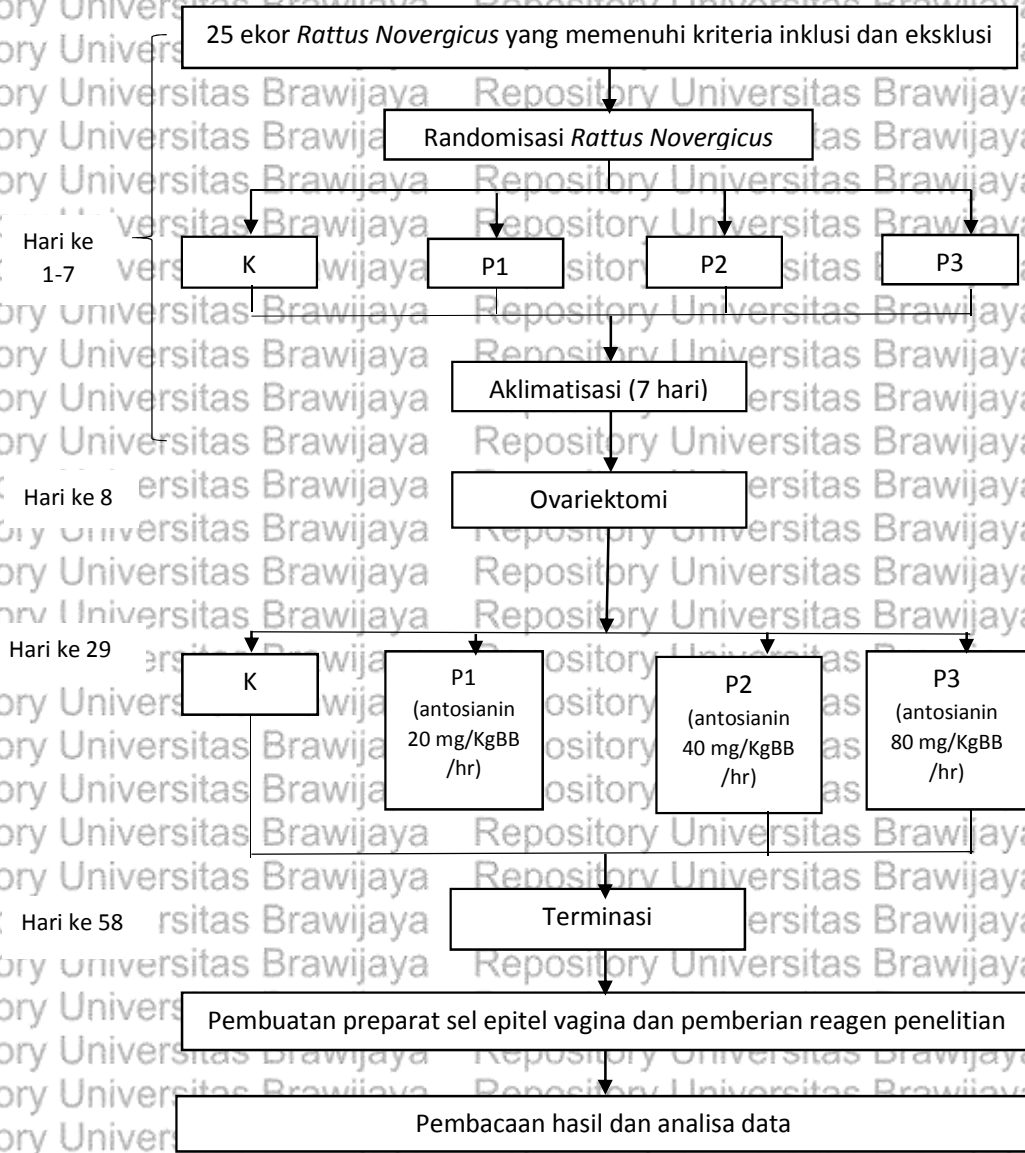
Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

Tabel 4.2 Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Keterangan	Satuan
Antosianin	Senyawa organik dari golongan flavonoid dengan rumus molekul $C_{15}H_{11}O$, berat molekul 207,08 gram/mol, dengan kadar 447,49 mg/L. Hasil purifikasi dari ubi jalar (<i>Ipomoea batatas</i> L.) varietas ungu kultivar gunung kawi dengan kandungan petunidin dan cyanidin. Ekstraksi dan purifikasi dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA ITB oleh Dr. Ciptati MS, M.Sc. Dosis antosianin yang diberikan yaitu 20, 40 dan 80 mg/KgBB/hr, diberikan dengan dilarutkan pada 1 cc air dan dimasukkan melalui sonde.	mg/KgBB/hari
Ekspresi p53	Prosentase sel epitel vagina tikus yang mengekspresikan p53. Diukur menggunakan metode imunohistokimia dengan antibodi primer p53 dan diwarnai menggunakan DAB kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dengan 20 lapang pandang. Sel yang mengekspresikan p53 dihitung dengan cara melihat jumlah sel yang berwarna coklat dibandingkan dengan jumlah sel yang normal.	Prosetase (%)
Indeks apoptosis	Prosentase sel epitel vagina tikus ovariektomi yang mengalami apoptosis. Diukur menggunakan TUNEL assay kit. Sel diwarnai menggunakan DAB kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dengan 20 lapang pandang. Indeks apoptosis dihitung dari prosentase sel yang mengalami apoptosis yaitu sel yang berwarna coklat dibandingkan dengan sel yang tidak mengalami apoptosis.	Prosetase (%)
Ketebalan sel epitel vagina	Ukuran ketebalan epitel vagina tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) ovariektomi dengan batas lamina propia. Menggunakan preparat histopatologi dengan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus DP71 dengan perbesaran 400x. Ketebalan epitel vagina diukur dengan menghitung rerata dari 4 titik menggunakan software Image raster.	µm



4.6 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian Pengaruh Antosianin Terhadap Ekspresi p53, Indeks Apoptosis dan Ketebalan Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi

Keterangan :

- K : Dilakukan ovariectomi tetapi tidak diberikan antosianin
- P1 : Dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dosis 20 mg/KgBB /hr
- P2 : Dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dosis 40 mg/KgBB /hr
- P3 : Dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dosis 80 mg/KgBB /hr



4.7 Pengolahan dan Analisis Data

Dalam penelitian ini menggunakan beberapa analisa data yaitu :

1. Deskriptif

2. Analitik

a. Uji komparasi

Menggunakan uji komparasi *One Way Anova*. Terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* *LSD (Least Significance Different)* untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna.

b. Uji korelasi

Menggunakan uji korelasi *Pearson*. Nilai koefisien korelasi adalah $-1 \leq r \leq 1$. Angka koelasi menunjukkan besaran dan arah hubungan antara dua variabel, yaitu positif atau negatif. Koefisien korelasi antara kedua variabel menurut Dahlan (2013), adalah sebagai berikut :

0,00 – 0,199 = sangat lemah 0,60 – 0,799 = kuat

0,20 – 0,399 = lemah 0,80 – 1,000 = sangat kuat

0,40 – 0,599 = sedang

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Prosedur administratif

1. Mendapatkan surat kelaikan etik.
2. Mendapatkan surat pengantar dari Prodi Magister Kebidanan FKUB kepada tempat – tempat penelitian yang dituju untuk melakukan penelitian.



4.8.2 Prosedur teknis

1. Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi merupakan prosedur untuk mengkondisikan hewan coba dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stres. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa dibiarkan selama 1 minggu di dalam kandang untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan diberikan pakan standar.

2. Proses pemeliharaan hewan coba

Tikus putih betina ditempatkan pada tempat untuk memelihara tikus yaitu bak plastik berukuran 40 cm x 30 cm x 20 cm, tutup kandang tikus dari kawat, di dalamnya diberi botol air dan sekam. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5 - 1 cm dan diganti setiap 3 hari sekali atau bila telah kotor. Temperatur serta kelembaban ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Tikus diberi pakan standar dengan porsi makanan 40-50 gr/hari/ekor dan air minum (*ad libitum*).

3. Prosedur Ovariektomi

Tikus putih betina ditimbang dengan timbangan digital untuk menentukan dosis agen anestesi. Menyiapkan larutan anestesi pada tikus kemudian tikus dianestesi di daerah paha bagian dalam / luar secara intra muscular. Sekitar 5 menit, kemudian tikus akan tertidur (\pm 45 menit). Setelah itu meletakkan tikus di atas papan kayu dengan abdomen menghadap ke atas, lalu keempat kaki ditancapkan dengan jarum. Rambut abdomen dicukur di area bedah kemudian oleskan etanol. Lakukan sebuah insisi kecil tegak lurus peritoneal (*transverse peritoneal*). Lakukan pengikatan pada daerah distal tuba uterus dan potong kedua ovarium, kemudian lakukan pemeriksaan ovarium di Laboratorium Patologi Anatomi untuk memastikan apakah benar yang diambil adalah organ ovarium. Masukkan kembali tuba ke dalam kavum peritoneal, lalu jahit kembali.



Olesi bekas jahitan dengan povidon iodine. Lakukan perawatan pada tikus *post* ovariektomi. Tikus *post* ovariektomi ditempatkan pada kandang tunggal yang lalu diberi makan dan botol minum. Amati luka pada tikus rutin setiap hari, berikan antibiotik pada luka operasi tikus untuk mencegah terjadinya infeksi. Berikan makanan dan minuman tikus secara teratur dan perhatikan kebersihan kandang tikus

4. Prosedur pemberian antosianin

Antosianin diberikan mulai hari ke-28 setelah ovariektomi ketika tikus dalam kondisi hipoestrogen. Pemberian antosianin dilakukan selama 30 hari per oral melalui sonde. Untuk menghindari bias terkait perlakuan pada hewan coba maka dilakukan *single blinded*, pemberian antosianin akan dilakukan oleh orang lain (bukan peneliti). Dosis antosianin yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian sebelumnya yaitu pemberian antosianin pada dosis 40 mg/kgBB mempunyai pengaruh signifikan terhadap tikus betina yaitu dapat meningkatkan ketebalan endometrium (Utami, 2016).

Dengan demikian ditetapkan dosis antosianin adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok perlakuan I : 20 mg/kgBB
- b. Kelompok perlakuan II : 40 mg/kgBB
- c. Kelompok perlakuan III : 80 mg/kgBB

Penghitungan dosis antosianin dilakuakn dengan cara :

- a. Menimbang berat badan tikus pada tiap kelompok setiap 7 hari sekali
- b. Menentukan jumlah dosis antosianin yang diberikan setiap kali pemberian pada tikus dengan rumus:

$$\text{Dosis antosianin (mg)} = \text{Dosis yang diinginkan} \times \text{rata rata berat tikus} \times \text{jumlah tikus} \times 7 \text{ hari}$$

- c. Antosianin tersedia dalam bentuk padatan sehingga perlu dilakukan pengenceran dengan menggunakan aquades. Antosianin diberikan pada



volume yang tetap tapi dengan konsentrasi yang berbeda selama proses perlakuan. Jumlah cairan maksimal yang diberikan tergantung ukuran hewan coba. Pada rodentia normal nya tidak melampaui 1 ml/100 gr BB (BPOM, 2014). Sehingga pada penelitian ini antosianin diencerkan dengan aquades sebanyak 1 ml untuk 1 ekor tikus dalam 1 hari. Sehingga bila akan membuat stok antosianin dalam 7 hari tiap kelompok perlakuan , maka dibutuhkan larutan aquadest sebanyak $1 \text{ ml} \times 6 \text{ tikus} \times 7 \text{ hari} = 42 \text{ ml}$.

Selanjutnya antosianin diberikan secara per oral menggunakan sonde. Dengan cara sonde dihubungkan dengan spuit selanjutnya dimasukkan ke faring kemudian disemprotkan ke esophagus dan masuk ke lambung tikus.

5. Prosedur terminasi hewan coba dan pengambilan sampel organ

Tikus diterminasi dengan diberi agen anastesi dengan dosis 2 – 3 kali dosis anastesi yaitu injeksi *I.M.* Ketamin 0,6 ml. Tikus yang sudah mati diletakkan diatas alas papan dengan abdomen menghadap ke atas. Tikus ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan jarum suntik (*needle*) yang ditancapkan pada empat telapak kaki. Kemudian dilakukan pengambilan organ vagina tikus. Organ vagina tikus segera dimasukkan dalam botol berisi larutan *buffer formalin* 10% dan direndam selama 12-24 jam. Kemudian sampel organ dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan. Setelah dilakukan pengambilan sampel, bangkai tikus yang tersisa dan tidak digunakan tikus dikubur dengan kedalaman tanah minimal 1 meter dan tidak bertumpukan untuk mencegah timbulnya bau yang tidak sedap dan terkoreknya tanah oleh hewan pemangsa.

6. Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Vagina Tikus

Prosedur pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi. Organ vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah difiksasi menggunakan larutan *buffer formalin* 10% dipotong pada bagian distal dengan



ketebalan 2-3 mm. Memasukkan jaringan uterus ke dalam larutan formalin 10% sebelum diproses ke mesin *Tissue Tex Processor*. Selanjutnya diproses dengan menggunakan mesin *Tissue Tex Processor* selama 90 menit. Proses pengeblokan organ vagina dengan parafin dilakukan sesuai dengan kode jaringan. Selanjutnya organ vagina dipotong dengan menggunakan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron. Proses deparafinasi dilakukan dengan meletakkan potongan organ dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C. Proses hidrasi dilakukan dengan memasukkan ke dalam 2 tabung larutan *xylol* masing-masing dalam waktu 3 menit dan terakhir memasukkan ke dalam air mengalir selama 15 menit.

7. Pengukuran ekspresi p53 menggunakan teknik imunohistokimia.

Pada persiapan jaringan, slide dipanaskan pada *hot plate* pada suhu 60°C selama 45 menit. Kemudian dilakukan deparafinasi dengan cara mencucinya dengan *xylol* sebanyak 3 kali masing – masing selama 3 menit. Kemudian rendam slide ke dalam larutan ini secara berurutan : Etanol absolut Etanol 90%, Etanol 80%, Etanol 70% dan Aquades steril. Merendam slide dalam chamber yang berisi buffer sitrat dengan pH 6,0 kemudian memanaskan slide dalam *waterbath* dengan suhu 95°C, kemudian didinginkan. Selanjutnya mencuci slide dengan larutan PBS. Lalu dilakukan pewarnaan imunostaining, melakukan blocking peroksidase endogen untuk mengurangi bias dengan menutup protein yang bukan merupakan protein target, kemudian melakukan *blocking unspesifik* protein, melakukan inkubasi antibodi primer, melakukan inkubasi antibodi sekunder, menginkubasi SA-HRP dan aplikasi cromagen DAB untuk memunculkan warna.

Untuk tahap counterstaining, menggunakan *Lilis modifier*, untuk memberi warna dengan mengencerkan *Lilis modifier* dengan air bersih dengan



perbandingan 1 : 2 atau 1 : 10. Untuk tahap mounting menggunakan entellan untuk melindungi sampel sebelum diamati, dengan cara meneteskan entellan pada slide lalu dikeringkan. Setelah itu menutup slide dengan *cover glass*.

Pengamatan ekspresi p53 di epitel vagina menggunakan mikroskop Nikon E100 dengan perbesaran 1000x. Sel yang berwarna coklat merupakan sel yang mengekspresikan p53. Ekspresi p53 dihitung dari prosentase sel yang mengekspresikan p53 yaitu sel yang berwarna coklat dibandingkan dengan sel yang normal. Penghitungan ekspresi p53 dilakukan pada 20 lapang pandang. Penghitungan ekspresi p53 dilakukan oleh peneliti dan tenaga profesional laboratorium.

8. Pengukuran indeks apoptosis menggunakan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated Dntp Nick and Labeling*).

Melakukan deparafinasi preparat (blok paraffin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing – masing 3 menit. Kemudian rehidrasi preparat dengan menggunakan Etanol 100%, Etanol 95%, Etanol 70% dan Air selama. Rehidrasi preparat lagi menggunakan aquades steril. Kemudian tetesi preparat dengan 50 μ l TUNEL *labeling mix* (terdiri dari 5 μ l *terminal deoxynucleotidyl transferase* dan 45 μ l HRP-dUTP, inkubasi selama 40 menit pada suhu ruang.

Cuci preparat dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Lalu aplikasi cromagen DAB untuk memunculkan warna, dengan cara menetes dengan DAB (DAB chromagen : DAB buffer = 1 : 40). Untuk counterstaining menggunakan *Lilis modifier*, untuk memberi warna dengan mengencerkan *Lilis modifier* dengan air bersih dengan perbandingan 1 : 2 atau 1 : 10. Kemudian meneteskan *Lilis modifier*. Untuk tahap mounting menggunakan *entellan* untuk melindungi sampel sebelum diamati, dengan cara meneteskan entellan pada slide lalu dikeringkan. Setelah itu menutup slide dengan *cover glass*. Pengamatan apoptosis sel di epitel vagina dilakukan di bawah mikroskop Nikon E100 dengan



perbesaran 1000x. Sel yang berwarna coklat merupakan sel yang apoptosis. Indeks apoptosis dihitung dari prosentase sel yang mengalami apoptosis yaitu sel yang berwarna coklat dibandingkan dengan sel yang tidak mengalami apoptosis. Penghitungan indeks apoptosis dilakukan pada 20 lapang pandang. Penghitungan indeks apoptosis dilakukan oleh peneliti dan tenaga professional laboratorium.

9. Pengukuran Ketebalan Epitel Vagina

Sebelum ketebalan sel epitel diukur, preparat histologi sel epitel vagina dikonsultasikan terlebih dahulu pada ahli Patologi Anatomi (PA) untuk pembacaan hasil preparat (batas pengukuran ketebalan sel epitel vagina) yaitu sampai lamina propia. Epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus DP71 dengan perbesaran 400x. Ketebalan epitel vagina diukur dengan batas lamina propia, menggunakan software Image raster, dengan hasil pengukuran dalam satuan μm (Mikrometer). Ketebalan epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi diukur pada 4 titik, yaitu 2 titik tertinggi dan 2 titik terendah, kemudian hitung rerata dari pengukuran ketebalan sel epitel vagina pada 4 titik tersebut.

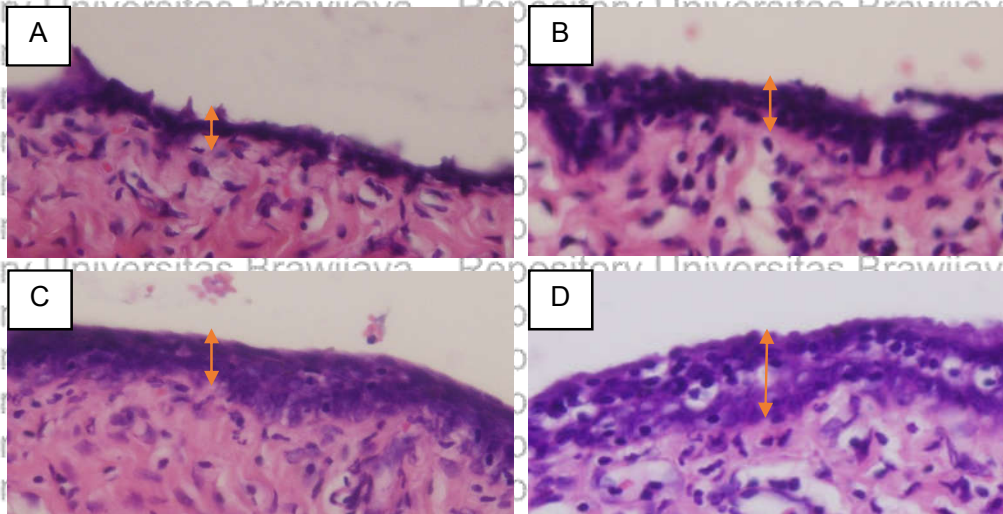


BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

5.1 Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi

Hasil pengamatan ketebalan sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi menggunakan mikroskop Olympus DP71 dengan pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (H&E) pada kelompok kontrol dan perlakuan antosianin berbagai dosis :



Gambar 5.1 Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis.

Hasil pengamatan ketebalan sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi. Pewarnaan menggunakan Hematoxylin dan Eosin (H&E) kemudian diamati menggunakan mikroskop Olympus DP71 dengan pembesaran 400x.

Gambar 5.1 diatas menunjukkan adanya perbedaan ketebalan epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok yang diberikan antosianin dengan berbagai dosis menunjukkan peningkatan ketebalan epitel vagina. Ketebalan epitel vagina pada kelompok kontrol (K) lebih tipis dibandingkan pada kelompok perlakuan yang diberikan antosianin. Ketebalan epitel vagina pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang



diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB lebih tebal dibanding kelompok kontrol. Ketebalan epitel vagina pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB lebih tebal dibanding kelompok perlakuan 1. Ketebalan epitel vagina pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB lebih tebal dibanding kelompok perlakuan 2. Dari keempat kelompok, kelompok perlakuan 3 (P3) merupakan kelompok dengan peningkatan ketebalan epitel vagina paling besar.

Hasil pengukuran ketebalan epitel vagina dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian antosianin berbagai dosis terhadap ketebalan epitel vagina. Uji *One Way Anova* digunakan dengan asumsi data normal dan homogen. Uji normalitas data pengaruh antosianin dengan berbagai dosis terhadap ketebalan epitel vagina dilakukan dengan menggunakan uji asumsi normalitas *Saphiro-Wilk* dengan kriteria data terdistribusi normal apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$. Sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan *Levene Test*, dengan kriteria data dikatakan homogen apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$. Dengan menggunakan *software SPSS* didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas terpenuhi.

Hasil uji komparasi pengaruh antosianin terhadap ketebalan sel epitel vagina pada semua kelompok dengan menggunakan uji *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD (*Least Significance Different*) ditampilkan dalam tabel berikut :



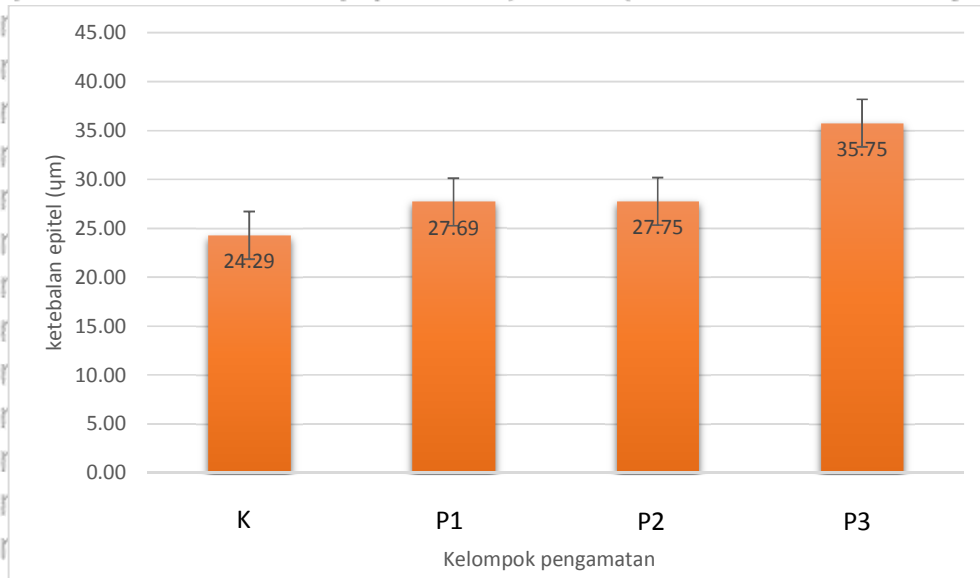
Tabel 5.2 Analisis Statistik Ketebalan Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

Kelompok pengamatan	n	Rerata Ketebalan epitel ($\bar{x} \pm SD$)	p-value
K (Kontrol)	6	24,28 \pm 0,78 ^a	0,000 < α
P1 (Antosianin 20 mg/KgBB/hr)	6	27,69 \pm 0,87 ^b	
P2 (Antosianin 40 mg/KgBB/hr)	6	27,75 \pm 1,10 ^b	
P3 (Antosianin 80 mg/KgBB/hr)	6	35,75 \pm 2,63 ^c	

Keterangan : Pada kolom rerata ketebalan epitel \pm SD yang memuat huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dan jika memuat huruf yang berbeda berarti terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Pada tabel 5.2 diatas menunjukkan bahwa ketebalan epitel pada kelompok kontrol (24,28 \pm 0,78^a) lebih kecil daripada kelompok perlakuan P1 (27,69 \pm 0,87^b), dan terdapat perbedaan yang bermakna rerata ketebalan epitel vagina antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 (P1). Kelompok perlakuan 1 (27,69 \pm 0,87^b) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (27,75 \pm 1,10^b) menunjukkan bahwa rerata ketebalan epitel pada kelompok perlakuan 2 lebih besar daripada kelompok perlakuan P1 namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna rerata ketebalan epitel vagina antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2. Kelompok perlakuan 2 (27,75 \pm 1,10^b) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 (35,75 \pm 2,63^c) menunjukkan bahwa rerata ketebalan epitel pada kelompok perlakuan 3 lebih besar daripada kelompok perlakuan 2 dan terdapat perbedaan yang bermakna rerata ketebalan epitel vagina antara kelompok perlakuan 3 dengan kelompok perlakuan 2.

Adanya perbedaan rerata ketebalan epitel vagina pada masing – masing kelompok menunjukkan bahwa pemberian antosianin pada berbagai dosis berpengaruh terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi. Berikut ini adalah sebaran nilai rerata pengaruh antosianin terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi :



Gambar 5.2 Histogram Perbandingan Ketebalan Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan.

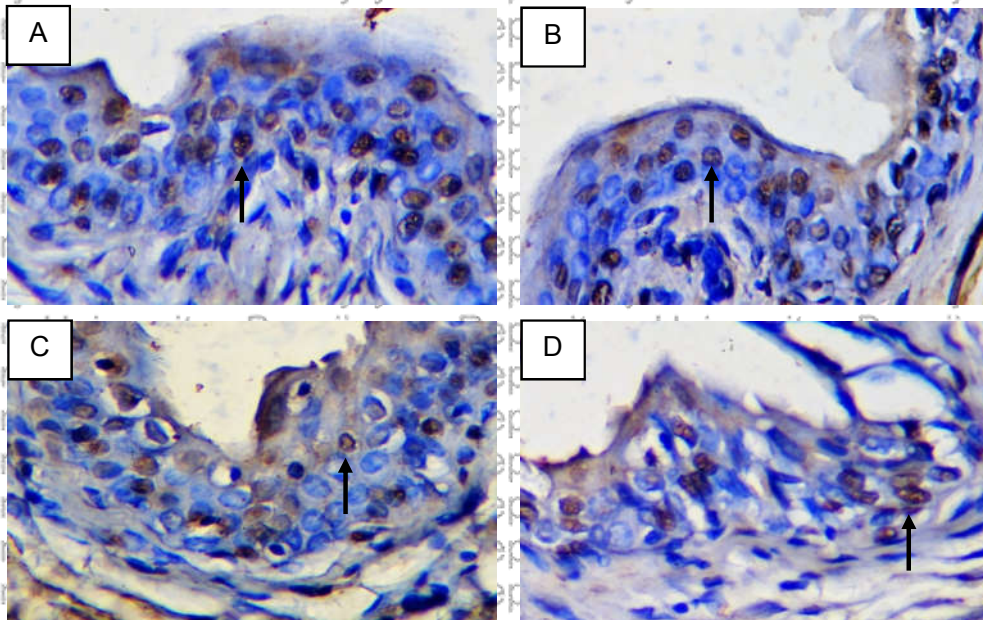
Kelompok kontrol (K) dilakukan ovariectomi tanpa diberikan antosianin, kelompok perlakuan 1 (P1) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr, kelompok perlakuan 2 (P2) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB/hr, dan kelompok perlakuan 3 (P3) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr.

Gambar 5.1 menunjukkan dari keempat kelompok dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata ketebalan epitel vagina yang paling tinggi, sedangkan kelompok kontrol yang dilakukan ovariectomi tetapi tanpa diberikan antosianin memiliki rata-rata ketebalan epitel yang paling rendah. Sementara analisis dari ketiga perlakuan tanpa kelompok kontrol dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata ketebalan epitel yang paling tinggi, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam meningkatkan ketebalan epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi pada penelitian ini.



5.2 Pengaruh Antosianin terhadap Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil pengamatan apoptosis sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dengan menggunakan metode TUNEL assay dengan pewarnaan DAB pada kelompok kontrol dan perlakuan antosianin berbagai dosis:



Gambar 5.3 Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis.

Hasil pemeriksaan apoptosis sel epitel vagina tikus putih ovariektomi: Pengecatan dilakukan dengan TUNEL assay kit. Sel diwarnai menggunakan DAB kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, sel yang mengalami apoptosis berwarna coklat yang ditunjukkan oleh arah panah.

Gambar 5.3 diatas menunjukkan bahwa apoptosis pada sel epitel vagina yang ditunjukkan dengan sel yang berwarna coklat, paling banyak terdapat pada gambar A yang merupakan kelompok kontrol (K) yang dilakukan ovariektomi namun tidak diberikan antosianin, pada gambar B yang merupakan kelompok perlakuan 1 (P1) yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dosis 20 mg/KgBB jumlah sel yang apoptosis lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol, pada gambar C yang merupakan kelompok perlakuan 2 (P2) yang dilakukan



ovariektomi dan diberikan antosianin dosis 40 mg/KgBB jumlah sel yang apoptosis lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan yang paling sedikit adalah pada gambar D yang merupakan kelompok perlakuan 3 (P3) yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB.

Hasil penghitungan indeks apoptosis vagina dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian antosianin berbagai dosis terhadap indeks apoptosis sel epitel vagina. Uji *One Way Anova* digunakan dengan asumsi data normal dan homogen. Uji normalitas data pengaruh antosianin dengan berbagai dosis terhadap indeks apoptosis sel epitel vagina dilakukan dengan menggunakan uji asumsi normalitas *Saphiro-Wilk* dengan kriteria data terdistribusi normal apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$. Sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan *Levene Test*, dengan kriteria data dikatakan homogen apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$. Dengan menggunakan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas terpenuhi.

Uji komparasi pengaruh antosianin terhadap indeks apoptosis menggunakan uji *One Way Anova*. Kriteria pengujian menyebutkan apabila $p\text{-value} < \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$ maka ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah ekspresi p53. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* LSD (*Least Significance Different*). Hasil analisis ditampilkan dalam tabel berikut :



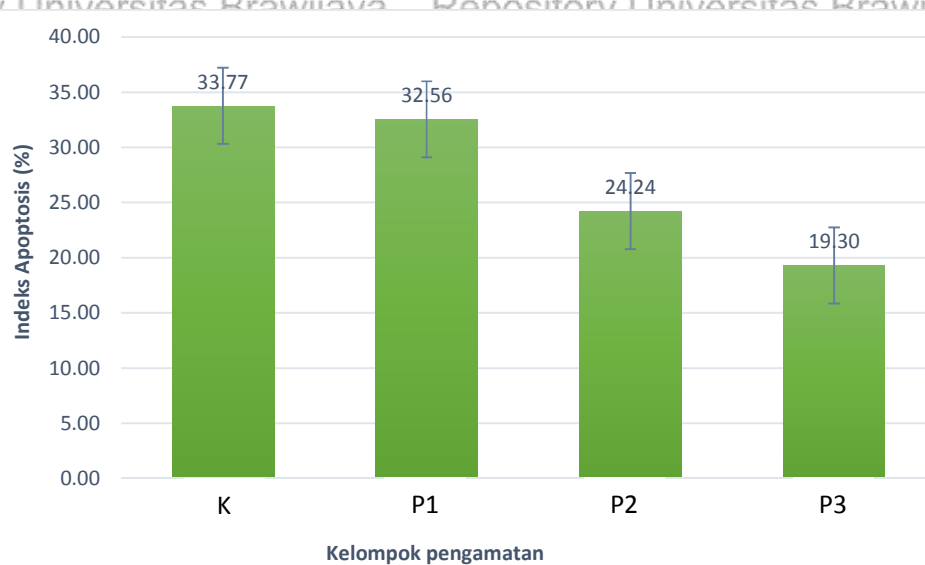
Tabel 5.2 Analisis Statistik Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

Kelompok pengamatan	n	Rerata Indeks Apoptosis ($\bar{x} \pm SD$)	p-value
K (Kontrol)	6	33,77 ± 3,63 ^a	0,000 < α
P1 (Antosianin 20 mg/KgBB/hr)	6	32,56 ± 5,05 ^a	
P2 (Antosianin 40 mg/KgBB/hr)	6	24,23 ± 3,46 ^b	
P3 (Antosianin 80 mg/KgBB/hr)	6	19,29 ± 2,77 ^b	

Keterangan : Pada kolom rerata indeks apoptosis ± SD yang memuat huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dan jika memuat huruf yang berbeda berarti terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa indeks apoptosis pada kelompok kontrol ($33,77 \pm 3,63^a$) lebih besar daripada kelompok perlakuan P1 ($32,56 \pm 5,05^a$), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna rerata indeks apoptosis antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 (P1). Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr belum dapat dikatakan berpengaruh terhadap penurunan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus ovariektomi. Kelompok perlakuan 1 ($32,56 \pm 5,05^a$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 ($24,23 \pm 3,46^b$) menunjukkan bahwa rerata indeks apoptosis kelompok perlakuan 2 (P2) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan terdapat perbedaan bermakna. Kelompok perlakuan 2 ($24,23 \pm 3,46^b$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 ($19,29 \pm 2,77^b$) menunjukkan bahwa rerata indeks apoptosis kelompok perlakuan 3 (P3) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 2 (P2) namun menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna.

Adanya perbedaan rerata pada masing – masing perbandingan menunjukkan bahwa pemberian antosianin pada berbagai dosis memberikan hasil yang berbeda – beda terhadap indeks apoptosis. Berikut ini adalah sebaran nilai rerata pengaruh antosianin terhadap indeks apoptosis sel epitel vagina yang disajikan dalam histogram dibawah ini:



Gambar 5.4 Histogram Perbandingan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan.

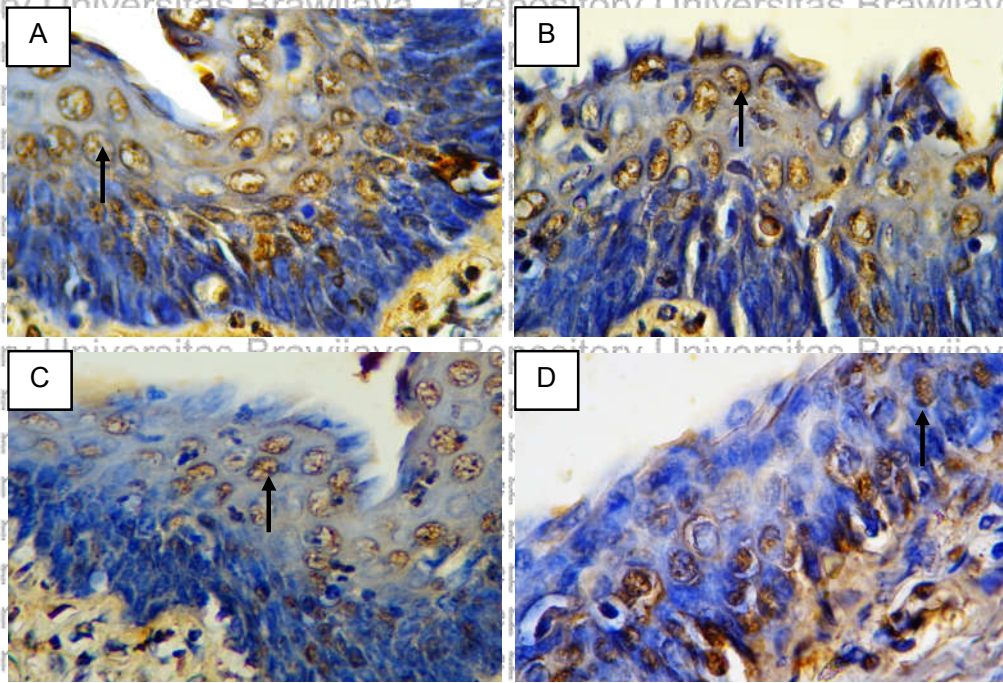
Kontrol (K) dilakukan ovariektomi tanpa diberikan antosianin, P1 (Perlakuan 1) yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr, P2 (Perlakuan 1) yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB/hr, dan P3 (Perlakuan 3) yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr.

Gambar 5.4 menunjukkan dari keempat kelompok dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling rendah, sedangkan kelompok kontrol yang dilakukan ovariektomi tetapi tanpa diberikan antosianin memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling tinggi. Sementara analisis dari ketiga perlakuan tanpa kelompok kontrol dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling rendah, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam menurunkan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus ovariektomi.



5.3 Pengaruh Antosianin terhadap Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil pengamatan ekspresi p53 sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dengan menggunakan metode imunohistokimia dengan pewarnaan DAB pada kelompok kontrol dan perlakuan antosianin berbagai dosis.



Gambar 5.5 Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan Antosianin Berbagai Dosis.

Hasil pemeriksaan ekspresi p53 sel epitel vagina tikus putih ovariektomi. Pengecatan dilakukan dengan imunohistokimia. Sel diwarnai menggunakan DAB dengan antibody monoklonal p53 dan dikarakterisasi dengan *double staining* menggunakan Lilis modifier sehingga menampilkan sitoplasma berwarna biru, kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Sel yang mengalami apoptosis berwarna coklat yang ditunjukkan oleh arah panah.

Gambar 5.5 diatas menunjukkan bahwa ekspresi p53 pada sel epitel vagina yang ditunjukkan dengan sel yang berwarna coklat paling banyak ditemukan pada gambar A yang merupakan kelompok kontrol (K), pada gambar B yang merupakan kelompok perlakuan 1 (P1) dengan pemberian antosianin dosis



20 mg/KgBB, jumlah ekspresi p53 lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol, pada gambar C yang merupakan kelompok perlakuan 2 (P2) dengan pemberian antosianin dosis 40 mg/KgBB, jumlah ekspresi p53 lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) dan yang paling sedikit adalah pada gambar D yang merupakan kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis antosianin 80 mg/KgBB.

Data hasil penghitungan ekspresi p53 dianalisis menggunakan uji komparasi *One Way Anova*. Untuk mengetahui apakah antosianin berpengaruh atau tidak terhadap ekspresi p53. Sebelum dilakukan uji komparasi, data pengaruh antosianin terhadap ekspresi p53 diuji normalitas dan uji homogenitas. Pengujian normalitas bertujuan untuk menentukan apakah data terdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji asumsi normalitas *Saphiro-Wilk*, dengan kriteria apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal. Begitu sebaliknya jika $p\text{-value} < \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$ maka data dinyatakan tidak terdistribusi normal, dan dilakukan uji homogenitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data memiliki ragam yang homogen atau tidak. Pengujian homogenitas pengaruh antosianin dalam berbagai dosis terhadap ekspresi p53 menggunakan *Levene Test*, dengan kriteria apabila $p\text{-value} > \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$ maka data dinyatakan homogen.

Dengan menggunakan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas dan homogenitas terpenuhi. Setelah uji prasyarat parametrik hasilnya memenuhi syarat yaitu data terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji komparasi pengaruh dosis antosianin terhadap ekspresi p53 yang menggunakan uji *One Way Anova*. Kriteria pengujian menyebutkan apabila $p\text{-value} < \text{taraf signifikansi } \alpha = 0,05$ maka ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah ekspresi p53. Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* LSD (*Least Significance Different*). Hasil analisis ditampilkan dalam tabel berikut :



Tabel 5.3 Analisis Statistik Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

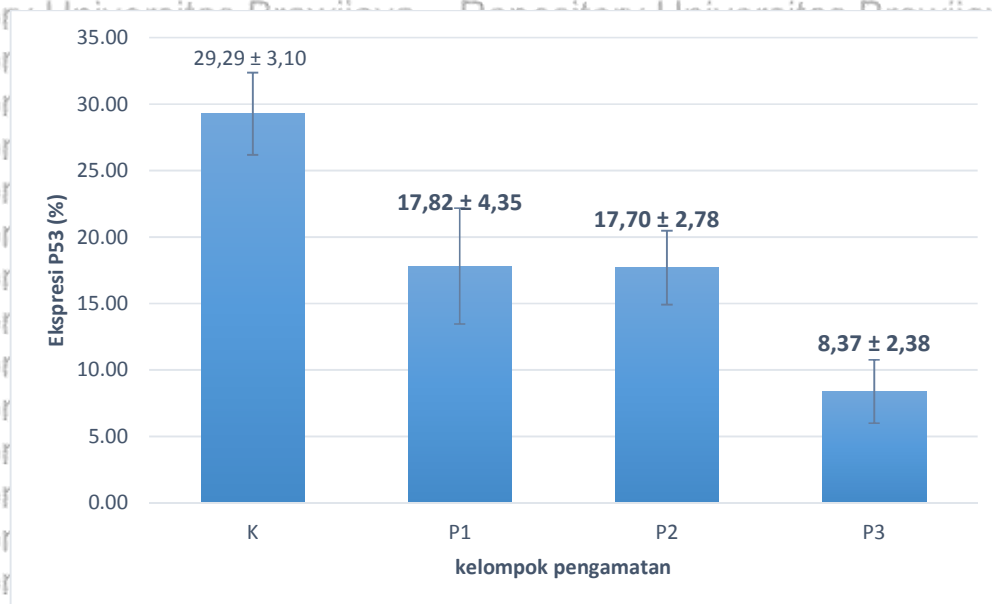
Kelompok pengamatan	n	Rerata Ekspresi p53 ($\bar{x} \pm SD$)	p-value
K (Kontrol)	6	29,29 \pm 3,10 ^a	0,000 < α
P1 (Antosianin 20 mg/KgBB/hr)	6	17,82 \pm 4,35 ^b	
P2 (Antosianin 40 mg/KgBB/hr)	6	17,70 \pm 2,78 ^b	
P3 (Antosianin 80 mg/KgBB/hr)	6	8,37 \pm 2,38 ^c	

Keterangan: Pada kolom rerata ekspresi p53 \pm SD yang memuat huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) dan jika memuat huruf yang berbeda berarti terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$).

Pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa ekspresi p53 pada kelompok kontrol (29,29 \pm 3,10 ^a) lebih besar daripada kelompok perlakuan. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariectomi. Kelompok perlakuan 1 (17,82 \pm 4,35 ^b) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (17,70 \pm 2,78 ^b) menunjukkan bahwa rerata ekspresi p53 kelompok perlakuan 2 (P2) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1) namun tidak terdapat perbedaan bermakna rerata ekspresi p53 antara kelompok perlakuan 1 (P1) dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Kelompok perlakuan 2 (17,82 \pm 4,35 ^b) dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 (17,70 \pm 2,78 ^b) menunjukkan bahwa rerata ekspresi p53 kelompok perlakuan 2 (P2) lebih besar daripada kelompok perlakuan 3 (P3), dan terdapat perbedaan yang bermakna rerata ekspresi p53 antara kelompok perlakuan 2 (P2) dengan kelompok perlakuan 1 (P1). Ekspresi p53 pada kelompok perlakuan 3 (P3) lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2) serta menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian antosianin dengan dosis Antosianin 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariectomi.



Adanya perbedaan nilai rerata pada masing – masing perbandingan menunjukkan bahwa pemberian antosianin pada berbagai dosis memberikan hasil yang berbeda – beda terhadap ekspresi p53. Berikut ini adalah sebaran nilai rerata pengaruh antosianin terhadap ekspresi p53 sel epitel vagina yang disajikan dalam histogram dibawah ini :



Gambar 5.6. Histogram Perbandingan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Antara Kelompok Kontrol dengan Kelompok Perlakuan.

Kontrol (K) dilakukan ovariectomi tanpa diberikan antosianin, P1 (Perlakuan 1) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr, P2 (Perlakuan 1) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB/hr, dan P3 (Perlakuan 3) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr.

Gambar 5.6 diatas menunjukkan bahwa kelompok kontrol yang dilakukan ovariectomi tanpa diberikan antosianin memiliki rata-rata ekspresi p53 yang paling tinggi, sedangkan kelompok perlakuan 3 (P3) yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata ekspresi p53 yang paling rendah. Sementara analisis dari ketiga perlakuan tanpa kelompok kontrol dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariectomi dan diberikan



antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata ekspresi p53 yang paling rendah, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

5.4 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis pada Sel Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.

Analisis korelasi ketebalan epitel dan indeks apoptosis menggunakan uji korelasi *Pearson* dengan hipotesis berikut ini:

H_0 : Tidak ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus ovariektomi setelah pemberian antosianin.

H_1 : Ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus ovariektomi setelah pemberian antosianin.

Hasil analisis hubungan ketebalan epitel dengan indeks apoptosis dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.4 Analisis Statistik Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.

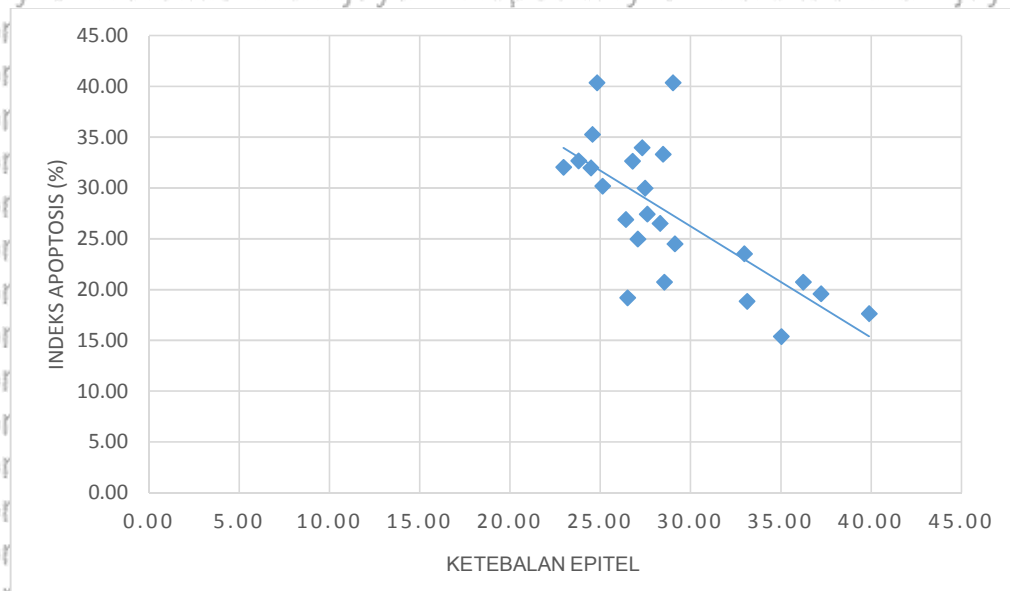
Variabel	p-value	r
Ketebalan epitel Indeks apoptosis	0,000 < α	-0,703

Keterangan : Hasil uji korelasi menggunakan uji korelasi *Pearson* dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$

Dari tabel 5.5 diatas didapatkan bahwa $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0,05$, sehingga dapat diartikan bahwa H_0 ditolak dan dinyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan antara Ketebalan Epitel dengan indeks apoptosis pada epitel vagina tikus (*Rattus Norvegicus*) ovariektomi. Koefisien korelasi (r) sebesar (-0,703) menunjukkan bahwa ada hubungan yang negatif, dengan kekuatan korelasi



kuat. Berikut ini adalah grafik korelasi ketebalan epitel dan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi :



Gambar 5.7 Grafik Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis pada Sel Epitel Vagina Tikus (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi.

Ada hubungan yang negatif antara ketebalan epitel dan indeks apoptosis, sehingga semakin tinggi ketebalan epitel maka indeks apoptosis akan semakin rendah.

Pada gambar 5.7 diatas menunjukkan bahwa semakin tinggi ketebalan epitel maka indeks apoptosis semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah ketebalan epitel maka indeks apoptosis semakin tinggi.

5.5 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.

Analisis korelasi ketebalan epitel dan ekspresi p53 menggunakan uji korelasi *Pearson* dengan hipotesis berikut ini :

H_0 : Tidak ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariektomi setelah pemberian antosianin.

H_1 : Ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariektomi setelah pemberian antosianin.



Hasil analisis hubungan ketebalan epitel dengan ekspresi p53 dapat dilihat pada tabel berikut :

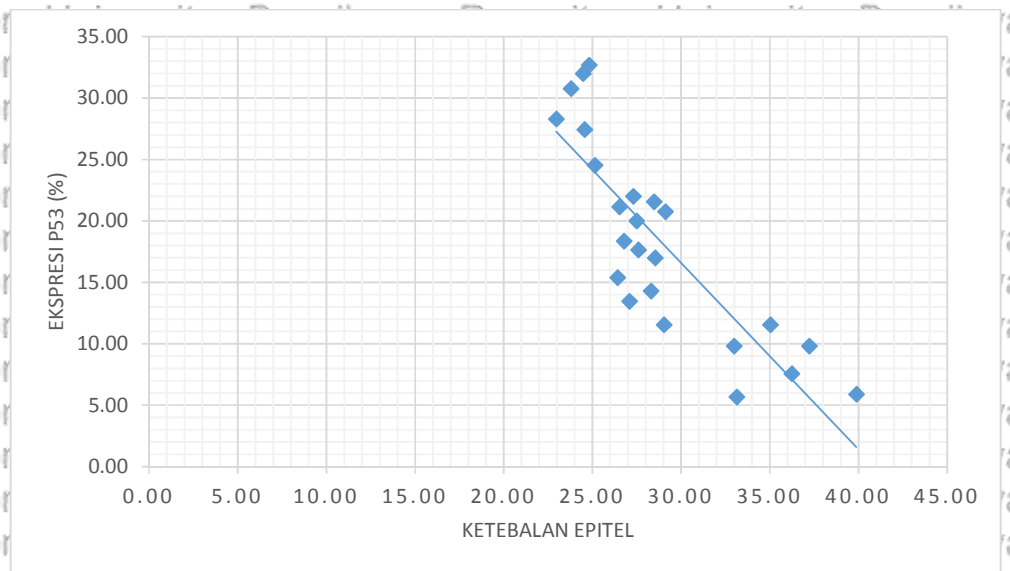
Tabel 5.5 Analisis Statistik Korelasi Ketebalan Epitel Dan Ekspresi p53 Pada Sel Epitel Vagina Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.

Variabel	p-value	r
Ketebalan epitel	0,000 < α	-0,845
Indeks apoptosis		

Keterangan : Hasil uji korelasi menggunakan uji korelasi *Pearson* dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$

Dari tabel 5.6 diatas didapatkan bahwa $p\text{-value} = 0,000 < \alpha = 0,05$, sehingga dapat diartikan bahwa H_0 ditolak dan dinyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan antara Ketebalan Epitel dengan indeks apoptosis pada epitel vagina tikus (*Rattus Norvegicus*) ovariektomi. Koefisien korelasi (r) sebesar (-0,845) menunjukkan bahwa ada hubungan yang negatif, dengan kekuatan korelasi sangat kuat.

Berikut ini adalah grafik korelasi ketebalan epitel dan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi :



Gambar 5.8 Grafik Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 pada Sel Epitel Vagina Tikus (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi.

Ada hubungan yang negatif antara ketebalan epitel dan ekspresi p53, sehingga semakin tinggi ketebalan epitel maka ekspresi p53 akan semakin rendah.



Pada gambar 5.8 diatas menunjukkan bahwa semakin tinggi ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin tinggi.

5.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Ekspresi P53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Perbandingan kekuatan korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan indeks apoptosis sel epitel vagina dan korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel dengan Indeks Apoptosis dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel dengan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin.

Variabel	p-value	r
a. Ketebalan epitel dengan Indeks apoptosis	$0,000 < \alpha$	-0,703
b. Ketebalan epitel dengan Ekspresi p53	$0,000 < \alpha$	-0,845

Keterangan : Hasil uji korelasi menggunakan uji korelasi *Pearson* dengan taraf signifikansi $\alpha = 0,05$

Dari tabel 5.6 diatas didapatkan bahwa koefisien korelasi (r) antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis sebesar 0,703 menunjukkan bahwa kekuatan korelasinya adalah kuat. Sedangkan koefisien korelasi (r) antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 sebesar 0,845 menunjukkan bahwa kekuatan korelasinya adalah sangat kuat.

Hal ini menunjukkan bahwa korelasi antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 lebih kuat dibandingkan korelasi antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis.



BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Antosianin terhadap Ketebalan Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil analisis data pengaruh pemberian antosianin terhadap ketebalan epitel vagina menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna rerata ketebalan pada epitel vagina yang diberikan antosianin pada berbagai dosis. Pada kelompok kontrol yang dilakukan ovariektomi tetapi tanpa diberikan antosianin memiliki rata-rata ketebalan epitel yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberikan antosianin. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yuliani (2014), tentang pengaruh pemberian ekstrak kacang tunggak terhadap ketebalan epitel vagina pada tikus putih ovariektomi, dijelaskan bahwa terjadi penipisan epitel vagina pada kelompok kontrol, yaitu kelompok yang dilakukan ovariektomi tetapi tidak diberikan ekstrak kacang tunggak.

Vagina merupakan organ yang sensitif akibat penurunan kadar estrogen pada wanita postmenopause. Hilangnya produksi estrogen ovarium berhubungan dengan atrofi vagina (Archer, 2010). Pada masa menopause terjadi penipisan lapisan epitel vagina, dan hilangnya sel intermediate, yang ditunjukkan dengan berkurangnya tinggi epitel secara keseluruhan (Zaino and Robboy, 2002). Penelitian menunjukkan bahwa ovariektomi pada tikus memiliki pengaruh terhadap penurunan yang signifikan pada tinggi epitel vagina (Park *et al.*, 2001). Epitel vagina pada tikus yang dilakukan ovariektomi mulai mengalami penipisan satu hari setelah dilakukan ovariektomi. Jumlah lapisan epitel vagina berkurang secara signifikan dibandingkan dengan tikus yang tidak dilakukan ovariektomi (Suzuki, 1995).



Atrofi vagina terjadi pada kondisi hipoestrogen. Epitel vagina yang terdiri dari epitel skuamosa bertingkat, yang semula sebelum menopause kondisinya lembab dan tebal dengan rugae, pada saat menopause seiring dengan menurunnya kadar estrogen, epithelium vagina menjadi menipis (Roy *et al.*, 2004). Efek estrogen endogen pada jaringan vulvovaginal dimediasi oleh reseptor estrogen (ERs) yang ditemukan di lokasi di seluruh area urogenital, termasuk vagina yang berperan dalam mengatur transkripsi pada DNA (Pettersson and Gustafsson, 2001). Estradiol-17 β (E2) merangsang proliferasi epitel vagina. Estradiol-17 β (E2) menampilkan efeknya melalui reseptor estrogen (ER), yang berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengaktifkan gen target di jaringan responsif E2 (Cooke *et al.*, 1998).

Turunnya kadar estrogen menjadikan estrogen tidak cukup untuk merubah konformasi reseptor estrogen (ER), sehingga menyebabkan tidak adanya interaksi antara estrogen dengan reseptor estrogen pada sisi akseptor DNA. Ekspresi gen menurun dimana gen tidak dikatalisis oleh enzim RNA polymerase yang akhirnya menyebabkan penurunan mRNA. Pada sisi lain tRNA juga menurun, sintesis materi sel menjadi menurun dan menyebabkan terjadinya penipisan pada sel epitel (Puspitadewi, 2007).

Penyebab lain terjadinya penipisan epitel vagina adalah estrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen α stroma, pada kondisi hipoestrogen, *epidermal growth factor* (EGF) yang merupakan protein tirosin kinase yang terdapat pada epitel pada kondisi tidak aktif. EGF dan tirosin kinase tidak dapat mengaktifkan protein kinase dalam sitoplasma sel. Protein kinase berupa *mitogen activated protein kinase* (MAPK) yang merupakan sinyal utama pengaktivasi transkripsi dan translasi tidak aktif, sehingga tidak terjadi sintesa protein yang diperlukan untuk mitosis sel - sel epitel. Jika tidak terjadi mitosis pada sel epitel, maka tidak akan terjadi proliferasi sel epitel dan menyebabkan sel epitel vagina menjadi tipis



(Kusmana *et al.*, 2010). Penipisan pada epitel vagina dapat menyebabkan elastisitas vagina berkurang karena aliran darah ke vagina berkurang, vagina akan terasa panas, gatal dan kering (Proverawati, 2010).

Sedangkan pada kelompok perlakuan yang dilakukan ovariektomi dan diberi antosianin, diketahui bahwa pemberian antosianin berpengaruh secara signifikan dalam meningkatkan ketebalan epitel vagina pada berbagai kelompok. Pada kelompok perlakuan 3 yang diberikan antosisnin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata ketebalan epitel yang paling tinggi, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam meningkatkan ketebalan epitel vagina tikus putih ovariektomi.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian dari Utami (2016), tentang pengaruh pemberian antosianin ubi jalar ungu terhadap ketebalan endometrium tikus putih betina yang dipapar asap rokok, menyebutkan bahwa pemberian antosianin ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) pada dosis 40 mg/KgBB dapat meningkatkan ketebalan endometrium tikus putih.

Data menunjukkan bahwa pada jaringan epitelium vagina, jumlah reseptor yang paling banyak ditemukan adalah reseptor estrogen α (Pessina, 2006).

Penelitian Schmitt dan Stopper (2001), mengemukakan bahwa kelas bioflavonoid seperti antosianidins memiliki potensi untuk berikatan dengan reseptor estrogen α .

Antosianidin menunjukkan aktivitas estrogenik yang signifikan. Hasil penelitian Utami (2016), menunjukkan bahwa antosianin ubi jalar varietas ungu dapat meningkatkan ekspresi estrogen reseptor α di endometrium tikus putih betina yang dipapar asap rokok.

Antosianin merupakan pewarna alami yang terdapat pada bunga, buah, dan sayuran. Antosianin berperan sebagai antioksidan. Struktur dan jalur biosintesis antosianin mirip dengan anggota kelas flavonoid lain yaitu flavanon dan



isoflavon. Karena itulah kemiripan dengan kedua golongan itulah antosianin diyakini juga memiliki aktivitas estrogenik (Safe, 1998).

Antosianidin yang merupakan aglikon dari antosianin yang menunjukkan aktivitas estrogenik yang lemah namun signifikan. Dalam pemberian antosianidin yang dikombinasi dengan estradiol, mereka menunjukkan aktivitas antiestrogenik, hal ini terjadi karena adanya kompetisi pada reseptor estrogen dan memiliki aktivitas intrinsik fitoestrogen yang lebih rendah dari pada estradiol. Jumlah gugus hidroksi berpengaruh besar pada aktivitas estrogen. Adanya dua gugus hidroksi dari struktur molekul dapat menurunkan afinitas antosianidin terhadap reseptor estrogen- α (Schmitt and Stopper, 2001).

Adanya fitoestrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen- α . Dapat mengaktifkan *epidermal growth factor* (EGF) sehingga memicu aktivasi protein kinase dalam sitoplasma sel yang berupa mitogen *activated protein kinase* (MAPK) yang menjadi sinyal utama pengaktivasi transkripsi dan translasi, sehingga terjadi sintesa protein untuk mitosis sel - sel epitel dan akan menyebabkan epitel berproliferasi sampai dapat dilihat pada ketebalan epitel yang semakin meningkat (Cooke *et al.*, 1998; Kusmana *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian teori yang telah diuraikan, maka penelitian membuktikan hipotesis bahwa antosianin dapat meningkatkan ketebalan epitel vagina pada tikus ovariektomi.

6.2 Pengaruh Antosianin terhadap Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian antosianin terhadap indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus ovariektomi. Dari keempat kelompok, dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariektomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr



memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling rendah, sedangkan kelompok kontrol yang dilakukan ovariectomi tetapi tanpa diberikan antosianin memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling tinggi. Sementara analisis dari ketiga perlakuan tanpa kelompok kontrol dapat diketahui bahwa kelompok yang dilakukan ovariectomi dan diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling rendah, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam menurunkan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus ovariectomi.

Hasil tersebut sejalan dengan penelitian (Sun *et al.*, 2012), yang melakukan penelitian tentang pengaruh antosianin dari ekstrak Bayberry China terhadap sel β pada penderita diabetes militus tipe 1. Penelitian ini menyebutkan bahwa antosianin mampu untuk melindungi sel β terhadap kerusakan sel (apoptosis dan nekrosis) yang diinduksi ROS secara *in vitro*.

Hal ini dapat terjadi karena terjadi kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif. Pada kondisi stres oksidatif, terjadi peroksidasi lipid dan kerusakan pada membran sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat diketahui dari rendahnya aktivitas SOD dan tingginya kadar MDA dalam plasma (Winarsi, 2007). Penelitian Setyarini (2015) mengungkapkan bahwa pada wanita menopause terjadi peningkatan stres oksidatif pada organ vagina, SOD mengalami peningkatan pada organ vagina tikus ovariectomi.

Periode pascamenopause dianggap sebagai awal dari proses penuaan pada wanita, yang disebabkan oleh perubahan endokrinologis karena penurunan estradiol (E2). Ketika wanita mulai mengalami penuaan ovarium, produksi E2 menjadi tidak menentu, perlindungan antioksidan hilang, dan stres oksidatif meningkat (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Stres oksidatif merupakan



ketidakseimbangan yang serius antara reaktif oksigen spesies (ROS) yang diproduksi dengan antioksidan. Ketika agen sitotoksik meningkat, kerusakan yang serius akan terjadi seperti pada lipid, protein, dan DNA (Finkel and Holbrook, 2000). Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel dan merusak membran sel kerusakan protein, dan DNA (Winarsi, 2007; Day, 2002).

Reactive Oxygen Species (ROS) dapat mengaktifkan sebuah cascade persinyalan intraselular (Ido *et al.*, 2001). Stres oksidatif dapat merangsang MAPK, yaitu sinyal yang terkait erat dengan kematian sel dan kelangsungan hidup sel (Kong, 2000). ROS terkait erat dengan apoptosis melalui jalur intrinsik, yang ditandai dengan adanya pelepasan faktor apoptogenik, seperti sitokrom C dan smac di mitokondria (Matsuzawa and Ichijo, 2005). Antioksidan memainkan peran penting dalam mengontrol apoptosis (Valco, 2007). Antosianin merupakan golongan flavonoid, yaitu senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan (Kumalaningsih, 2007). Dilaporkan bahwa ekstrak ubi ungu, yang mengandung kadar polifenol tinggi, menghambat peningkatan kadar MDA, antosianin ubi ungu menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas yang lebih kuat daripada pigmen lainnya (Han *et al.*, 2006ab; Kano *et al.*, 2005; Philpott *et al.*, 2004).

Antosianin dapat melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh stres oksidatif. Antosianin meningkatkan ekspresi BCL-2 (protein anti apoptosis) dan menurunkan Bad dan Bax (protein pro apoptosis) dan caspase 3 yang merupakan protease terkait dengan aktivitas kematian sel. Antosianin menekan apoptosis pada jalur intrinsik (Mok, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian ini serta kajian teori yang telah diuraikan, penelitian ini membuktikan bahwa antosianin dapat menurunkan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus ovariektomi.



6.3 Pengaruh Antosianin terhadap Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil analisis penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi p53 pada kelompok kontrol lebih besar daripada kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberikan antosianin dengan dosis 20 mg/KgBB/hr, kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberikan antosianin dengan dosis 40 mg/KgBB/hr dan kelompok perlakuan 3 (P3) yang diberikan antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr serta terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi p53 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pada perbandingan rerata ekspresi p53 kelompok perlakuan 3 (P3) dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2), rata-rata ekspresi p53 pada kelompok perlakuan 3 adalah yang paling rendah. Hal ini berarti bahwa pemberian antosianin berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariektomi dan pemberian antosianin dengan dosis 80 mg/KgBB/hr merupakan dosis yang paling berpengaruh dalam menurunkan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus ovariektomi.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Liu (2013), bahwa antosianin dari blueberry mampu memperbaiki fragmen dan kerusakan DNA yang disebabkan oleh penyinaran UV. Antosianin dari blueberry memiliki efek perlindungan pada sel yang disinari UV, yang mungkin terjadi terkait kandungan antioksidan pada antosianin blueberry. Penelitian ini menemukan, pada sel yang DNA nya mengalami kerusakan parah setelah penyinaran UV, terdapat peningkatan ekspresi protein p53, sedangkan pada sel yang telah diberikan antosianin dari blueberry, ekspresi p53 menurun. Hal ini menunjukkan bahwa antosianin dapat melakukan intervensi dalam perbaikan DNA.

Pada wanita yang mengalami penuaan ovarium, produksi estradiol menjadi tidak menentu, perlindungan antioksidan hilang, dan terjadi peningkatan stres



oksidatif (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Pada kondisi stres, p53 akan teraktivasi dan terjadi penghentian siklus sel dan perbaikan DNA atau apoptosis (Chène, 2003). Protein p53 memegang peranan penting dalam adanya respon stres selular. Pada siklus sel, protein p53 merupakan salah satu checkpoint penting untuk mengenali sesuatu penyimpangan pada sel misalnya DNA yang telah rusak (Tan, 2000). Adanya kerusakan pada DNA menyebabkan siklus sel akan masuk pada fase G₀ (istirahat) dan protein p53 akan teraktivasi yang disebut proses *p53-dependent* pada cekpoint G1/S. Protein p53 dikontrol oleh mdm2, sehingga pada saat teraktivasi, level mdm2 juga akan meningkat. Mdm2 menonaktifkan p53 dengan mendegradasi p53 (Vermeulen *et al.*, 2003). Pada kondisi sel yang tidak mengalami stres, p53 tidak aktif. Aktivasi terjadi ketika sel-sel stres atau rusak (Vogelstein, 2000).

Banyak penelitian melaporkan bahwa antosianin memiliki banyak potensi biologis dan fungsi farmakologi, seperti anti oksidatif (Shih *et al.*, 2007). Antosianin ubi ungu menunjukkan aktivitas radikal bebas yang lebih kuat daripada pigmen lainnya (Kano *et al.*, 2005; Philpott *et al.*, 2004). Antosianin merupakan antioksidan yang poten, serta mempunyai kemampuan mereduksi oksigen spesies secara cepat yang kemudian merubahnya menjadi radikal aryloxyl yang lebih stabil (Kähkönen and Heinonen, 2003; Moran *et al.* 1997). Antosianin dapat berperan sebagai *scavenger* yang bisa menangkap radikal bebas (Shipp and Abdel-Aal, 2010). Antosianin dapat melindungi sel dari kerusakan yang diinduksi oleh stres oksidatif (Mok, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian teori yang telah diuraikan, maka penelitian membuktikan hipotesis bahwa antosianin dapat menurunkan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus ovariectomi.



6.4 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin

Hasil dari penelitian ini menyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi dengan arah hubungan yang negatif. Hal ini berarti semakin tinggi ketebalan epitel maka indeks apoptosis semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah ketebalan epitel maka indeks apoptosis semakin tinggi.

Hasil penelitian Sato (1997) menunjukkan bahwa ovariectomi menginduksi apoptosis pada vagina. Terjadi perubahan morfologis dalam apoptosis sel vagina yang terlihat melalui mikroskop elektron. Fragmentasi DNA pada vagina meningkat setelah dilakukan ovariectomi.

Pada saat menopause terjadi peningkatan stres oksidatif dikarenakan adanya penurunan kadar estrogen oksidatif (Ghosh *et al.*, 2009). Pada konsentrasi tinggi, ROS bisa menyebabkan kerusakan struktur sel, asam nukleat, Lipid dan protein (Valko *et al.*, 2007). Estrogen, terutama estradiol diketahui mampu memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif selama masa reproduksi. Selain itu, struktur kimia molekul estradiol memungkinkan mereka untuk bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas yang mencegah kerusakan oksidatif (Pansini *et al.*, 2005). Pada kondisi hipoestrogen, epidermal growth factor (EGF) yang merupakan protein tirosin kinase yang terdapat pada epitel pada kondisi tidak aktif. EGF dan tiroksin kinase tidak dapat mengaktifkan protein kinase dalam sitoplasma sel. Protein kinase berupa mitogen activated protein kinase (MAPK) yang merupakan sinyal utama pengaktifasi transkripsi dan translasi tidak aktif, sehingga tidak terjadi sintesa protein yang diperlukan untuk mitosis sel-sel epitel. Jika tidak terjadi mitosis pada sel epitel, maka tidak akan terjadi proliferasi sel epitel dan menyebabkan sel epitel vagina menjadi tipis (Kusmana *et al.*, 2010).



Pada sel epitel yang diberikan antosianin dalam berbagai dosis terjadi peningkatan ketebalan epitel dan berkurangnya apoptosis sel. Pada kelompok yang diberikan antosianin, stres oksidatif seluler menurun sehingga terjadi penurunan apoptosis. Antosianin dapat berperan sebagai scavenger yang bisa menangkap radikal bebas. Sehingga tidak akan terjadi kerusakan seluler yang dapat memicu apoptosis sel. Penelitian Schmitt (2001), mengemukakan bahwa kelas bioflavonoid seperti antosianidins memiliki potensi untuk berikatan dengan reseptor estrogen- α . Antosianidin menunjukkan aktivitas estrogenik yang signifikan.

Epidermal growth factor (EGF) menjadi aktif sehingga memicu aktivasi protein kinase dalam sitoplasma sel yang berupa mitogen activated protein kinase (MAPK) yang menjadi sinyal utama pengaktivasi transkripsi dan translasi, sehingga terjadi sintesa protein untuk mitosis sel - sel epitel dan proliferasi sel epitel meningkat (Cooke *et al.*, 1998; Kusmana *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian ini, membuktikan bahwa hipotesis terdapat korelasi ketebalan epitel vagina dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi terbukti.

6.5 Analisis Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin

Hasil dari penelitian ini menyatakan bahwa ada hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariectomi dengan arah hubungan yang negatif. Hal ini berarti semakin tinggi ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin tinggi.

Adanya korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan ekspresi p53 ini sejalan dengan hasil penelitian Kostov (2010) yang meneliti tentang ekspresi p53



dan indeks mitosis pada ketebalan melanoma, penelitian tersebut menyebutkan bahwa ada korelasi positif antara ketebalan melanoma dan ekspresi p53. Namun pada sel yang normal, ketebalan epitel dan ekspresi p53 memiliki arah korelasi negatif.

Pertumbuhan sel dalam individu diatur oleh suatu sistem keseimbangan. Apabila terjadi apoptosis berlebihan, maka suatu sistem organ akan mengalami kemunduran fungsi yang dapat menimbulkan penyakit. Sebaliknya, apabila terjadi proliferasi berlebihan, maka akan membentuk suatu massa tumor yang akan mengarah pada kanker (Sudiana, 2011). Protein p53 merupakan protein yang berperan sebagai tumor suppressor dan sebagai regulator siklus sel. Protein p53 memegang peranan penting dalam adanya respon stres selular (Tan, 2000). Dalam kondisi sel yang normal tanpa stres, ekspresi p53 sangat rendah (Vogelstein *et al.*, 2000). Namun pada kondisi stres, p53 akan teraktivasi dan terjadi penghentian siklus sel dan perbaikan DNA atau apoptosis (Chène, 2003).

ROS juga dapat menyebabkan p53 mengalami mutasi. Mutasi ini akan menimbulkan aktivitas supresor menjadi non aktif dan berhubungan dengan proliferasi dan progresi tumor (Gao *et al.*, 2011). Pada tingkat sel, kerusakan akibat oksidan menimbulkan respon yang bermacam – macam (Martindale and Holbrook, 2002). ROS memiliki dampak yang signifikan pada pertumbuhan sel, kelangsungan hidup dan perkembangan, dan tumor (Chao *et al.*, 2003). p53 memainkan peranan penting dan kompleks dalam respon seluler terhadap stres oksidatif (Nakamizo *et al.*, 2008). Dalam menanggapi tingkat stres oksidatif yang rendah, p53 memainkan peran antioksidan. Sejumlah gen target p53, termasuk sestrin, *glutathion peroksidase* (GPX), dan *aldehida dehidrogenase* (ALDH), terlibat dalam mengurangi tekanan oksidatif (Budanov *et al.*, 2004).



Hasil penelitian ini menyebutkan bahwa pada pemberian antosianin dapat menurunkan ekspresi p53 dan meningkatkan ketebalan epitel vagina pada tikus ovariektomi serta terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dengan ekspresi p53. Berdasarkan hasil penelitian ini, membuktikan bahwa hipotesis terdapat korelasi antara ketebalan epitel vagina dan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi terbukti.

6.6 Perbandingan Kekuatan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Indeks Apoptosis dan Korelasi Antara Ketebalan Epitel Vagina dengan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Setelah Pemberian Antosianin

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa korelasi antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 lebih kuat dibandingkan korelasi antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis. Terdapat hubungan yang signifikan antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 pada sel epitel vagina tikus putih (*Rattus norvegicus*) ovariektomi dengan arah hubungan yang negatif. Hal ini berarti semakin tinggi ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin rendah, dan sebaliknya semakin rendah ketebalan epitel maka ekspresi p53 semakin tinggi.

Pada saat menopause terjadi peningkatan stres oksidatif dikarenakan adanya penurunan kadar estrogen oksidatif (Ghosh *et al.*, 2009). Produksi estradiol menjadi tidak menentu, perlindungan antioksidan hilang, dan terjadi peningkatan stres oksidatif (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan yang serius antara *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) yang diproduksi dan pertahanan dari sistem antioksidan (Finkel and Holbrook, 2000). ROS memiliki dampak yang signifikan pada pertumbuhan sel, kelangsungan hidup dan perkembangan, dan tumor (Chao *et al.*, 2003). p53 memainkan peranan penting dan kompleks dalam respon seluler terhadap stres oksidatif (Nakamizo *et al.*, 2008).



Dalam menanggapi tingkat stres oksidatif yang rendah, p53 memainkan peran antioksidan. Sejumlah gen target p53, termasuk sestrin, glutathion peroksidase (GPX), dan aldehida dehydrogenase (ALDH), terlibat dalam mengurangi tekanan oksidatif (Budanov et al., 2004). Aktivasi terus-menerus dari p53 dalam menanggapi tekanan oksidatif tingkat tinggi dapat mengakibatkan sel mengalami kematian dan penuaan organisme (Liu et al., 2010). Apabila DNA dalam sel rusak, p53 berperan penting dalam menentukan apakah DNA akan diperbaiki atau sel yang rusak akan mengalami apoptosis (Genetics Home Reference, 2017). Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan suatu mekanisme kontrol yang mendorong sel mengalami kematian sebagai akibat kerusakan DNA yang tidak bisa diperbaiki (Ghobrial et al., 2005).

Protein penekan tumor p53 adalah sensor universal dari tekanan genotoksik dan, sebagai faktor transkripsi, yang memainkan peran penting dalam mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam menengahi penahanan pertumbuhan dan / atau kematian sel. ROS terlibat dalam berbagai tingkatan dalam sinyal p53. ROS adalah aktivator p53 yang potensial. P53 dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik dimana pada kondisi stres oksidatif yang meningkat, p53 mengaktifkan Bax (protein pro apoptosis) (Mok, 2014). Jadi p53 berperan penting dalam menentukan apakah DNA akan diperbaiki atau sel yang rusak akan mengalami apoptosis. Apabila sel masih dapat diperbaiki oleh p53, maka sel tidak akan apoptosis dan pembelahan sel secara normal dapat dilanjutkan. Untuk menjamin bahwa DNA berduplikasi dengan akurat dan benar, terdapat mekanisme *checkpoint* p53, guna mendeteksi kerusakan DNA. Apabila terdapat kerusakan DNA, *checkpoint* akan memacu *cell cycle arrest* sementara untuk perbaikan DNA.



6.7 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini antara lain :

1. Belum dapat dipastikan berapakah dosis antosianin yang benar – benar optimal karena dalam penelitian ini hanya menggunakan 3 variasi dosis.
2. Penelitian ini hanya melihat efek dari stres oksidatif pada tikus ovariektomi yang kemudian diberikan antosianin, tanpa melihat indikator dari stres oksidatif pada tikus ovariektomi setelah diberikan antosianin.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan juga pembahasan pada penelitian pengaruh antosianin terhadap ekspresi p53, indeks apoptosis dan ketebalan epitel vagina pada tikus (*Rattus norvegicus*) ovariectomi ini, maka dapat disimpulkan :

1. Antosianin dapat meningkatkan ketebalan sel epitel vagina pada tikus (*Rattus norvegicus*) ovariectomi.
2. Antosianin dapat menurunkan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus (*Rattus norvegicus*) ovariectomi.
3. Antosianin dapat menurunkan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus (*Rattus norvegicus*) ovariectomi
4. Terdapat korelasi yang negatif dengan kekuatan korelasi kuat antara ketebalan epitel dan indeks apoptosis sel epitel vagina pada tikus ovariectomi (*Rattus norvegicus*) yang diberikan antosianin.
5. Terdapat korelasi yang negatif dengan kekuatan korelasi sangat kuat antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 sel epitel vagina pada tikus ovariectomi (*Rattus norvegicus*) yang diberikan antosianin.
6. Korelasi antara ketebalan epitel dengan ekspresi p53 lebih kuat dibandingkan korelasi antara ketebalan epitel dengan indeks apoptosis.

7.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis yang beragam, dan dilakukan uji toksisitas pada antosianin ubi jalar ungu varietas gunung kawi sebelum digunakan pada manusia.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aal I.H., Abdel-Hamid G.A., Selim M.E., 2015. Restoration of Vaginal Epithelial Atrophy in Ovariectomized Rats with Sex Steroid Hormones, *MOJ Anat Physiol* **1**(2): 00007.
- Adams J.M. and Cory S., 2001. Life-Or-Death Decisions By The Bcl-2 Protein Family, *Trends In Biochemical Sciences*, **26**(1): 61-66.
- Agarwal A. and Allamaneni S.S., 2004. Role of Free Radicals in Female Reproductive Diseases and Assisted Reproduction, *Reprod Biomed Online*, **9**.
- Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A. and Gupta S., 2012. The Effects of Oxidative Stress on Female Reproduction: A Review, *Reproductive Biology and Endocrinolog.*, **10** (1): 49.
- Al-Azzawi F. and Palacios S., 2009. Hormonal Changes During Menopause, *Maturitas*. **63** (2): 135-137.
- Al-Baghdadi O. and Ewies A., 2009. Topical Estrogen Therapy in The Management of Postmenopausal Vaginal Atrophy: An Up-to-Date Overview, *Climacteric*. **12** (2): 91-105.
- Aningsih B.S.D., 2016. Pengaruh Antosianin Ubi Jalar (*Ipomoea Batatas L*) Varietas Ungu Terhadap Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Ovarium Uterus dan Kadar 17 β -estradiol Ovarium pada Tikus Putih Betina yang Dipapar Asap Rokok. Tesis. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Archer D.F., 2010. Efficacy and Tolerability of Local Estrogen Therapy for Urogenital Atrophy, *Menopause*, **17**(1): 194-203.
- Bachmann G.A. and Nevadunsky N.S., 2000. Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis, *American family physician*, **61**(10): 3090-3096.
- Bagchi K. and Puri S., 1998. Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease: A Review.
- Benardot D. and Clarkson P., 2001. Can vitamin supplements improve sport performance, *Sports Science Exchange Roundtable*, **12**(3): 1-4.
- Björnström L. and Sjöberg M., 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, *Molecular endocrinology*, **19**(4): 833-842.
- Bragulla H.H. and Homberger D.G., 2009. Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia, *Journal of Anatomy*, **214**(4): 516-559.
- Bratton D.L., Fadok V.A., Richter D.A., Kailey J.M., Guthrie L.A. Henson P.M., 1997. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-Mediated Nonspecific Flip-Flop and is Enhanced by Loss of The Aminophospholipid Translocase, *Journal of Biological Chemistry*, **272**(42): 26159-26165.



Budanov A.V., Sablina A.A., Feinstein E., Koonin E.V. and Chumakov P.M., 2004. Regeneration of Peroxiredoxins by p53-Regulated Sestrins, Homologs of Bacterial AhpD, *Science*, **304**(5670): 596-600.

Caillouette J.C., Sharp C.F., Zimmerman G.J. and Roy S., 1997. Vaginal pH as a Marker for Bacterial Pathogens and Menopausal Status, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **176**(6): 1270-1277.

Chang Y.-C. and Chuang L.-M., 2010. The Role of Oxidative Stress in The Pathogenesis of Type 2 Diabetes: From Molecular Mechanism to Clinical Implication, *Am J Transl Res*, **2**(3): 316-331.

Chao C., Hergenahm M., Kaeser M.D., Wu Z., Saito S.I., Iggo R., *et al.*, 2003. Cell Type- and Promoter-Specific Roles of Ser18 Phosphorylation in Regulating p53 Responses, *Journal of Biological Chemistry*, **278**(42): 41028-41033.

Chatterjee M., Saluja R., Kanneganti S., Chinta S. and Dikshit M., 2006. Biochemical and Molecular Evaluation of Neutrophil NOS in Spontaneously Hypertensive Rats, *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, **53**(1): 84-93.

Chène P., 2003. Inhibiting The p53-MDM2 Interaction: An Important Target for Cancer Therapy, *Nature Reviews Cancer*, **3**(2): 102-109.

Chipuk J. Dangreen D., 2006. Dissecting p53-Dependent Apoptosis, *Cell Death & Differentiation*, **13**(6): 994-1002.

Cooke P.S., Buchanan D.L., Lubahn D.B. and Cunha G.R., 1998. Mechanism of Estrogen Action: Lessons from The Estrogen Receptor-A Knockout Mouse, *Biology of Reproduction*, **59**(3): 470-475.

Day C., 2002. Pathogenesis of Steatohepatitis, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **16**(5): 663-678.

Deberardinis R.J., Sayed N., Ditsworth D. and Thompson C.B., 2008. Brick By Brick: Metabolism and Tumor Cell Growth, *Current Opinion in Genetics & Development*, **18**(1): 54-61.

Dennerstein L., Dudley E. and Burger H., 2001. Are changes in sexual functioning during midlife due to aging or menopause?, *Fertility and sterility*, **76**(3): 456-460.

Dennerstein L., Dudley E.C., Hopper J.L., Guthrie J.R. and Burger H.G., 2000. A Prospective Population-Based Study of Menopausal Symptoms, *Obstetrics & Gynecology*, **96**(3): 351-358.

Donaldson M.S., 2004. Nutrition and Cancer: A Review of The Evidence for an Anti-Cancer Diet, *Nutrition Journal*, **3**(1): p. 19.

Doshi S.B. and Agarwal A., 2013. The Role of Oxidative Stress in Menopause, *Journal of mid-life health*, **4** (3): 140.

Dröge W., 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function, *Physiological Reviews*, **82**(1): 47-95.



Elmore S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, **35**(4): 495-516.

Eschenbach D.A., Patton D.L., Meier A., Thwin S.S., Aura J., Stapleton A., *et al.*, 2000. Effects of Oral Contraceptive Pill Use on Vaginal Flora and Vaginal Epithelium, *Contraception*, **62**(3): 107-112.

Evans M.D., Dizdaroglu M. and Cooke M.S., 2004. Oxidative DNA damage and Disease: induction, repair and significance, *Mutat Res*, 567.

Fernandes I., Faria A., Calhau C., De Freitas V. and Mateus N., 2014. Bioavailability of Anthocyanins and Derivatives, *Journal of Functional Foods*, **7**: 54-66.

Finkel T. Danholbrook N.J., 2000. Oxidants, Oxidative Stress and The Biology of Ageing, *Nature*, **408**(6809): Pp. 239-247.

Freeman E.W., 2015. Depression in The Menopause Transition: Risks in The Changing Hormone Milieu as Observed in The General Population, *Women's Midlife Health*, **1** (1): 2.

Freeman E.W., Sammel M.D., Lin H., Gracia C.R., Pien G.W., Nelson D.B., *et al.*, 2007. Symptoms Associated with Menopausal Transition and Reproductive Hormones in Midlife Women, *Obstetrics & Gynecology*, **110** (2, Part 1): 230-240.

Fridman J.S. Danlowe S.W., 2003. Control of Apoptosis by p53, *Oncogene*, **22**(56): 9030-9040.

Gao M., Li Y., Sun Y., Shah W., Yang S., Wang Y., *et al.*, 2011. Benzo [A] Pyrene Exposure Increases Toxic Biomarkers and Morphological Disorders in Mouse Cervix, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **109**(5): 398-406.

Gartner, Lp., Hiatt, JI. 2012. Atlas Berwarna Histopatologi Edisi Kelima. Binarupa – Aksara. Tangerang.

Gavrilescu L.C. and Kers E.Y., 2003. Apoptosis and The Balance of homeostatic and Pathologic Responses to Protozoan Infection, *Infection and Immunity*, **71**(11): 6109-6115.

Genetics Home Reference, 2017. TP53 gene. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>.

Gewies A., 2003. Introduction to Apoptosis, *Apo Review*, **3**(1): 1-26.

Ghobrial I.M., Witzig T.E. and Adjei A.A., 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **55**(3): 178-194.

Ghosh D., Griswold J., Erman M. and Pangborn W., 2009. Structural Basis For Androgen Specificity and Oestrogen Synthesis in Human Aromatase, *Nature*, **457**(7226): 219-223.

Giuliano, F *et al.*, 2001. A Preclinical Model of Menopause: The Ovariectomized Female Rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**(1): 140-9.



Giusti M.M. and Wrolstad R.E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current protocols in food analytical chemistry*.

Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by Uv-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

Gold E.B., Sternfeld B., Kelsey J.L., Brown C., Mouton C., Reame N., et al., 2000. Relation of Demographic and Lifestyle Factors to Symptoms in A Multi-Racial/Ethnic Population of Women 40–55 Years of Age, *American Journal of Epidemiology*, **152**(5): 463-473.

Grady D., 2006. Management of Menopausal Symptoms, *New England Journal of Medicine*, **355**(22): 2338-2347.

Green D.R. Reed J.C., 1998. Mitochondria and Apoptosis, *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, **281**(5381): 1309-1311.

Gurer-Orhan H., Sabir H.U. and Özgüneş H., 2004. Correlation Between Clinical Indicators of Lead Poisoning and Oxidative Stress Parameters In Controls and Lead-Exposed Workers, *Toxicology*, **195**(2): 147-154.

Guyton A.C., 2000. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9. EGC. Jakarta.

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

Han K.-H., Hashimoto N., Shimada K.-I., Sekikawa M., Noda T., Yamauchi H., et al., 2006a. Hepatoprotective Effects of Purple Potato Extract Against D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**(6): 1432-1437.

Han K.-H., Sekikawa M., Shimada K.-I., Hashimoto M., Hashimoto N., Noda T., et al., 2006b. Anthocyanin-Rich Purple Potato Flake Extract Has Antioxidant Capacity and Improves Antioxidant Potential in Rats, *British Journal of Nutrition*, **96**(6): 1125-1134.

Hedrich HJ. 2006. Taxonomy and stock and strains, *J Lab Rat*. 71-92.

Heffner, Linda J & Schrust Dj. 2010. *At A Glance Sistem Reproduksi*. Edisi Kedua. Erlangga Medical Series. Jakarta.

Heim K.E., Tagliaferro A.R. and Bobilya D.J., 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**(10): 572-584.

Hubrecht R.C. and Kirkwood J., 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, John Wiley & Sons.

Ito Y., Chang K.C., Lejeune W.S., Bjercke R.J., Reiser K.M., Williamson J.R., et al., 2001. Vascular Dysfunction Induced by AGE is Mediated by VEGF Via Mechanisms Involving Reactive Oxygen Species, Guanylate Cyclase, and Protein Kinase C, *Microcirculation*, **8**(4): 251-263.



Ishida H., Suzuno H., Sugiyama N., Innami S., Tadokoro T. and Maekawa A., 2000. Nutritive Evaluation on Chemical Components of Leaves, Stalks and Stems of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*), *Food Chemistry*, **68**(3): Pp. 359-367.

Jang, Y. P., Zhou, J., Nakanishi, K. & Sparrow, J. R. 2005. Anthocyanins Protect Against A2e Photooxidation and Membrane Permeabilization In Retinal Pigment Epithelial Cells. *Photochemistry and Photobiology*, **81**, 529-536.

Johnson G.L. and Lapadat R., 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and P38 Protein Kinases, *Science*, **298**(5600): 1911-1912.

Juo P., Kuo C.J., Yuan J. and Blenis J., 1998. Essential Requirement for Caspase-8/FLICE in The Initiation of The Fas-Induced Apoptotic Cascade, *Current Biology*, **8**(18): 1001-1008.

Kähkönen M.P. and Heinonen M., 2003. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(3): 628-633.

Kahwati L.C., Haigler L. and Rideout S., 2005. What is The Best Way to Diagnose Menopause?, *Clinical Inquiries*.

Kano M., Takayanagi T., Harada K., Makino K. and Ishikawa F., 2005. Antioxidative Activity of Anthocyanins From Purple Sweet Potato, *Ipomoea Batatas* Cultivar Ayamurasaki, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **69**(5): 979-988.

Kataoka T., Schröter M., Hahne M., Schneider P., Irmiler M., Thome M., et al., 1998. FLIP Prevents Apoptosis Induced by Death Receptors but not by Perforin/Granzyme B, Chemotherapeutic Drugs, and Gamma Irradiation, *The Journal of Immunology*, **161**(8): 3936-3942.

Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K. and Kobori M., 2003. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium Myrtillus*) and The Anthocyanins, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **51**(1): 68-75.

Khusniyati E., Sari A.A., Yueniwati Y., Noorhamdani N., Nurseta T. and Keman K., 2014. The Effects of *Vigna unguiculata* on Cardiac Oxidative Stress and Aorta Estrogen Receptor- β Expression of Ovariectomized Rats, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **3**(4): 263-267.

Knight J.A., 2000. Free Radicals, Antioxidants, and The Immune System, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **30**(2): 145-158.

Konczak I. and Zhang W., 2004. Anthocyanins—More Than Nature's Colours, *Biomed Research International*, **2004**(5): 239-240.

Kong A.-N.T., Yu R., Chen C., Mandlekar S. and Primiano T., 2000. Signal Transduction Events Elicited by Natural Products: Role of MAPK and Caspase Pathways in Homeostatic Response and Induction of Apoptosis, *Archives of Pharmacal Research*, **23**(1): 1-16.

Kostov M., Mijovic Z., Mihailovic D., Cerovic S., Stojanovic M. and Jelic M., 2010. Correlation of Cell Cycle Regulatory Proteins (P53 and P16 and Bcl-2



Oncoprotein With Mitotic Index and Thickness of Primary Cutaneous Malignant Melanoma; *Bosn J Basic Med Sci*, **10**(4): 276-281.

Kovacic P. and Jacintho J.D., 2001. Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer, *Current Medicinal Chemistry*, **8**(7): 773-796.

Krychman M., 2007. Vaginal Atrophy: The 21st Century Health Issue Affecting Quality of Life, *Medscape Ob/Gyn & Women's Health*.

Kumalaningsih, S. 2007. *Antioksidan Alami*. Trubus Agrisarana, Surabaya

Kumar, Robbins, Leonard, S., Vinay,. 2010. Neoplasia in: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier: 269-342.

Kusmana D., Lestari R., Dewi A., Ratri P. dan Soraya R., 2010. Efek Estrogenik Ekstrak Etanol 70% Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Terhadap Mencit (*Mus musculus* L.) betina yang diovariectomi, *Makara Journal of Science*.

Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 8,50,68.

Levine A.J. Oren M., 2009. The First 30 Years of p53: Growing Ever More Complex, *Nature Reviews. Cancer*, **9**(10): 749.

Lewis-Wambi J.S. dan Jordan V.C., 2009. Estrogen Regulation of apoptosis: How can One Hormone Stimulate and Inhibit?, *Breast cancer research*, **11**(3): 206.

Lila M.A., 2004. Anthocyanins and Human Health: An in Vitro Investigative Approach, *Biomed Research International*, **2004**(5): 306-313.

Liu D., Ou L, Clemenson Jr G.D., Chao C., Lutske M.E, Zambetti G.P., *et al*, 2010. Puma is Required for p53-Induced Depletion of Adult Stem Cells, *Nature Cell Biology*, **12**(10): Pp. 993-998.

Liu W., Lu X., He G., Gao X., Li M., Wu J., *et al*, 2013. Cytosolic Protection Against Ultraviolet Induced DNA Damage by Blueberry Anthocyanins and Anthocyanidins in Hepatocarcinoma HepG2 Cells, *Biotechnology Letters*, **35**(4): 491-498.

Lobo V., Patil A., Phatak A. and Chandra N., 2010. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact On Human Health, *Pharmacognosy Reviews*, **4**(8): 118.

Lumongga, Fitriani. 2008. Apoptosis. Universitas Sumatera Utara. Medan.

Lushchak V.I., 2011. Adaptive Response to Oxidative Stress: Bacteria, Fungi, Plants and Animals, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **153**(2): 175-190.

Lushchak V.I., 2012. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions, *Journal of Amino Acids*, 2012.



Martin K., Kirkwood T. dan Potten C.S., 1998. Age Changes in Stem Cells of Murine Small Intestinal Crypts, *Experimental Cell Research*, **241**(2): 316-323.

Martindale J.L. and Holbrook N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival, *Journal of cellular physiology*, **192**(1): 1-15.

Matsuzawa A. and Ichijo H., 2005. Stress-Responsive Protein Kinases in Redox-Regulated Apoptosis Signaling, *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**(3-4): 472-481.

Mccord J.M., 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress, *The American Journal of Medicine*, **108**(8): 652-659.

McCubrey J.A., LaHair M.M. and Franklin R.A., 2006. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of The MAP Kinase Signaling Pathways, *Antioxidants & Redox Signaling*, **8**(9-10): 1775-1789.

Meier P., Finch A. and Evan G., 2000. Apoptosis in Development, *Nature*, **407**(6805): 796-801.

Miller D.M., Buettner G.R. and Aust S.D., 1990. Transition Metals as Catalysts of "Autoxidation" Reactions, *Free Radical Biology and Medicine*, **8**(1): 95-108.

Miller L., Patton D.L., Meier A., Thwin S.S., Hooton T.M. And Eschenbach D.A., 2000. Depomedroxyprogesterone-Induced Hypoestrogenism and Changes in Vaginal Flora and Epithelium, *Obstetrics & Gynecology*, **96**(3): 431-439.

Mishra G.D. and Kuh D., 2012. Health Symptoms During Midlife in Relation to Menopausal Transition: British Prospective Cohort Study, *Bmj*, **344**: e402.

Mok J.W., Chang D.-J. and Joo C.-K., 2014. Antiapoptotic Effects of Anthocyanin from The Seed Coat of Black Soybean Against Oxidative Damage of Human Lens Epithelial Cell Induced by H₂O₂, *Current Eye Research*, **39**(11): 1090-1098.

Muppidi J.R., Tschopp J. and Siegel R.M., 2004. Life and Death Decisions: Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction, *Immunity*, **21**(4): 461-465.

Nicholson D., 1999. Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function During Apoptotic Cell Death, *Cell Death and Differentiation*, **6**(11): 1028-1042.

Norbury C.J. and Hickson I.D., 2001. Cellular responses to DNA damage, *Annual review of pharmacology and toxicology*, **41**(1): 367-401.

Norimura T., Nomoto S., Katsuki M., Gondo Y. Dankondo S., 1996. p53-Dependent Apoptosis Suppresses Radiation-Induced Teratogenesis, *Nature Medicine*, **2**(5): 577-580.

Nursyah, D.A. 2012. *Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (Rattus norvegicus) Ovariektomi yang Diberi Tepung Daging Teripang (Holothuria scabra)*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Skripsi : Tidak diterbitkan.



Nyberg K.A., Michelson R.J., Putnam C.W. and Weinert T.A. 2002. Toward Maintaining The Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints, *Annual Review of Genetics*, **36**(1): 617-656.

Oancea S. and Oprean L., 2011. Anthocyanins, from Biosynthesis in Plants to Human Health Benefits, *Acta Universitatis Cimbinesis, Series E: Food Technology*, **15**(1).

Pacher P., Beckman J.S. and Liaudet L., 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, *Physiological Reviews*, **87**(1): 315-424.

Palackal N.T., Lee S.H., Harvey R.G., Blair I.A. and Penning T.M., 2002. Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbontrans-Dihydrodiol Proximate Carcinogens by Human Aldo-Keto Reductase (AKR1C) Enzymes and Their Functional Overexpression in Human Lung Carcinoma (A549) Cells, *Journal of Biological Chemistry*, **277**(27): 24799-24808.

Panda S., Das A., Santa Singh A. and Pala S., 2014. Vaginal pH: A Marker for Menopause, *Journal of Mid-Life Health*, **5**(1): 34.

Pansini F., Mollica G. and Bergamini C.M., 2005. Management of The Menopausal Disturbances and Oxidative Stress, *Current Pharmaceutical Design*, **11**(16): 2063-2073.

Park K., Ahn K., Lee S., Ryu S., Park Y. and Azadzi K., 2001. Decreased Circulating Levels of Estrogen Alter Vaginal and Clitoral Blood Flow and structure in The Rabbit, *International Journal of Impotence Research*, **13**(2): 116.

Parks D.M. and Levine J., 2015. Helping Women Understand Treatment Options for Vulvar and Vaginal Atrophy, *Nursing for Women's Health*, **19**(4): 298-312.

Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F. 2003. The Stomach as a Site for Anthocyanins Absorption from Food, *FEBS Lett.* **544**: 210-213.

Patton D.L., Thwin S.S., Meier A., Hooton T.M., Stapleton A.E. and Eschenbach D.A., 2000. Epithelial Cell Layer Thickness and Immune Cell Populations in The Normal Human Vagina at Different Stages of The Menstrual Cycle, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **183**(4): 967-973.

Pekham, Michelle. 2011. At a Glance Histologi. Penerbit Erlangga. Jakarta

Pessina M.A., Hoyt Jr R.F., Goldstein I. and Raish A.M., 2006. Differential Effects of Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Vaginal Structural Integrity, *Endocrinology*, **147**(1): 61-69.

Pettersson K. and Gustafsson J.-Å., 2001. Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen Action, *Annual Review of Physiology*, **63**(1): 165-192.

Philpott M., Gould K.S., Lim C. and Ferguson L.R., 2004. In Situ and in Vitro Antioxidant Activity of Sweetpotato Anthocyanins, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, **52**(6): 1511-1513.

Pitzschke A. and Hirt H., 2006. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling in Plants, *Plant Physiology*, **141**(2): 351-356.



Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S. and Seger R., 2011. The MAPK Cascades: Signaling Components, Nuclear Roles and Mechanisms of Nuclear Translocation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1813**(9): 1619-1633.

Prior R.L. and Cao G., 2000. Flavonoids: Diet and Health Relationships, *Nutrition in Clinical Care*, **3**(5): 279-288.

Proverawati, A. 2010. Menopause Dan Sindrom Premenopause. Edisi 1. Nuha Medika. Yogyakarta.

Puspitadewi, S. S., 2007. Potensi Agensia Anti Fertilitas Biji Tanaman Jarak (*Jatropha curcas*) Dalam Mempengaruhi Profil Uterus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. *Jurnal Sains Dan Matematika*, **15**, 1-6.

Putra, A. P., 2009. Efektifitas Pemberian Kedelai Pada Tikus Putih Terhadap Pertumbuhan Dan Reproduksi Anak Tikus Betina. Institut Pertanian Bogor.

Randolph Jr J.F., Sowers M., Bondarenko I.V., Harlow S.D., Luborsky J.L. and Little R.J., 2004. Change in Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone Across The Early Menopausal Transition: Effects of Ethnicity and Age, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **89** (4): 1555-1561.

Rautureau G.J., Day C.L. Danhinds M.G., 2010. Intrinsically Disordered Proteins in Bcl-2 Regulated Apoptosis, *International Journal of Molecular Sciences*, **11**(4): 1808-1824.

Ravingerová T., Barančík M. and Strnisková M., 2003. Mitogen-Activated Protein Kinases: A New Therapeutic Target in Cardiac Pathology, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **247**(1-2): 127-138.

Reddish S., 2011. Menopausal Transition: Assessment in General Practice, *Australian family physician*, **40** (5): 266.

Ridnour L.A., Isenberg J.S., Espey M.G., Thomas D.D., Roberts D.D. and Wink D.A., 2005. Nitric Oxide Regulates Angiogenesis Through a Functional Switch Involving Thrombospondin-1, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America, **102**(37): 13147-13152.

Riley T., Sontag E., Chen P. Danlevine A., 2008. Transcriptional Control of Human p53-Regulated Genes, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**(5): 402.

Rock C.L., Jacob R.A. Danbowen P.E., 1996. Update on The Biological Characteristics of The Antioxidant Micronutrients: Vitamin C, Vitamin E, and The Carotenoids, *Journal of The American Dietetic Association*, **96**(7): 693-702.

Roy S., Caillouette J., Roy T. and Faden J., 2004. Vaginal pH is Similar to Follicle-Stimulating Hormone for Menopause Diagnosis, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **190**(5): 1272-1277.

Ruder E.H., Hartman T.J., Blumberg J. Dangoldman M.B., 2008. Oxidative Stress and Antioxidants: Exposure and Impact on Female Fertility, *Human Reproduction Update*, **14**(4): 345-357.



Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E. and Chumakov P.M., 2005. The Antioxidant Function of The p53 Tumor Suppressor, *Nature Medicine*, **11**(12): 1306.

Sakahira H., Enari M. and Nagata S., 1998. Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation During Apoptosis, *Nature*, **391**(6662): 96.

Sánchez-Rodríguez M.A., Zacarias-Flores M., Arronte-Rosales A., Correa-Muñoz E. and Mendoza-Núñez V.M., 2012. Menopause as Risk Factor for Oxidative Stress, *Menopause*, **19**(3): 361-367.

Santoso, W. E. A. & Estiasih, T. 2014. Jurnal Review: Kopigmentasi Ubi Jalar Ungu (Ipomoea Batatas Var. Ayamurasaki) dengan Kopigmen Na-Kaseinat dan Protein Whey Serta Stabilitasnya Terhadap Pemanasan [In Press Oktober 2014]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, **2**, 121-126.

Sato T., Fukazawa Y., Kojima H., Enari M., Iguchi T. and Ohta Y., 1997. Apoptotic Cell Death During The Estrous Cycle in The Rat Uterus and Vagina, *The Anatomical Record*, **248**(1): 76-83.

Sato T., Fukazawa Y., Kojima H., Ohta Y. and Iguchi T., 2003. Multiple Mechanisms are Involved in Apoptotic Cell Death in The Mouse Uterus and Vagina After Ovariectomy, *Reproductive Toxicology*, **17**(3): 289-297.

Satue-Gracia M.T., Heinonen M. and Frankel E.N., 1997. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(9): 3362-3367.

Scambia G., Mango D., Signorile P.G., Angeli R.A., Palena C., Gallo D., et al., 2000. Clinical Effects of A Standardized Soy Extract in Postmenopausal Women: A Pilot Study, *Menopause*, **7**(2): 105-111.

Schmitt E. and Stopper H., 2001. Estrogenic Activity of Naturally Occurring Anthocyanidins, *Nutrition and Cancer*, **41**(1-2): 145-149.

Schuler M. and Green D. 2001, Mechanisms of P53-Dependent Apoptosis. Portland Press Limited.

Seedat S., Scott K.M., Angermeyer M.C., Berglund P., Bromet E.J., Brugha T.S., et al., 2009. Cross-National Associations Between Gender and Mental Disorders in The World Health Organization World Mental Health Surveys, *Archives of General Psychiatry*, **66** (7): 785-795.

Sekhon L.H. and Agarwal A., 2013. The Menopause and Oxidative Stress, in *Studies on Women's Health*, Springer, 181-203.

Setyarini A.I., 2015. Pengaruh Ekstrak Vigna Unguilata Terhadap Kadar SOD, Kadar MDA, Aktivitas MAPK dan Proliferasi Fibroblas Vagina Rattus Norvergicus Pasca Ovariectomi. Tesis. Universitas Brawijaya.

Shen J. and Tower J., 2009. Programmed Cell Death and Apoptosis in Aging and Life Span Regulation, *Discovery Medicine*, **8**(43): 223-226.

Sherman S., 2005. Defining The Menopausal Transition, *The American Journal Of Medicine*, **118** (12): 3-7.



Shih P.-H., Yeh C.-T. and Yen G.-C., 2007. Anthocyanins Induce The Activation of Phase II Enzymes Through The Antioxidant Response Element Pathway Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(23): 9427-9435.

Shipp J. and Abdel-Aal E.-S.M., 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients, *The Open Food Science Journal*, **4**(1).

Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, non-Redundant Roles During The Demolition Phase of Apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 7320-6.

Spierings D., Mcstay G., Saleh M., Bender C., Chipuk J., Maurer U., et al., 2005. Connected to Death: The (Unexpurgated) Mitochondrial Pathway of Apoptosis, *Science*, **310**(5745): 66-67.

Stenberg A., Heimer G., Ulmsten U. and Cnattingius S., 1996. Prevalence of Genitourinary and Other Climacteric Symptoms in 61-Year-Old Women, *Maturitas*, **24**(1-2): 31-36.

Sturdee D. Danpanay N., 2010. Recommendations for The Management of Postmenopausal Vaginal Atrophy, *Climacteric*, **13**(6): 509-522.

Sun C.-D., Zhang B., Zhang J.-K., Xu C.-J., Wu Y.-L., Li X., et al., 2012. Cyanidin-3-Glucoside-Rich Extract from Chinese Bayberry Fruit Protects Pancreatic B Cells and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice, *Journal of Medicinal Food*, **15**(3): 288-298.

Suzuki A., Enari M., Abe Y., Ohta Y. and Iguchi T., 1995. Effect of Ovariectomy on Histological Change and Protein Expression in Female Mouse Reproductive Tracts, *In Vivo (Athens, Greece)*, **10**(1): 103-110.

Talavéra S., Felgines C., Texier O., Besson C., Manach C., Lamaison J.-L., Rémésy C. 2004. Anthocyanins are Efficiently Absorbed from The Small Intestine in Rats, *J. Nutr.* **134**: 2275-2279.

Tan D.T., Tang W.Y., Liu Y.P., Goh H.-S. and Smith D.R., 2000. Apoptosis and Apoptosis Related Gene Expression in Normal Conjunctiva and Pterygium, *British Journal of Ophthalmology*, **84**(2): 212-216.

Taylor R.C., Cullen S.P. and Martin S.J., 2008. Apoptosis: Controlled Demolition at The Cellular Level, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**(3): 231.

Thompson I., Van Der Bijl P., Van Wyk C. and Van Eyk A., 2001. A Comparative Light-Microscopic, Electron-Microscopic and Chemical Study of Human Vaginal and Buccal Epithelium, *Archives of Oral Biology*, **46**(12): 1091-1098.

Utami S.W., 2016. Pengaruh Antosianin Ubi Jalar (*Ipomoea Batatas L*) Varietas Ungu Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen A dan Ketebalan Endometrium pada Uterus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Betina yang Dipapar Asap Rokok. Tesis. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., 2007. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**(1): 44-84.

Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M., 2006. Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer, *Chemico-Biological Interactions*, **160**(1): Pp. 1-40.

Vermeulen K., Van Bockstaele D.R. and Berneman Z.N., 2003. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer, *Cell Proliferation*, **36**(3): 131-149.

Vogelstein B., Lane D. and Levine A.J., 2000. Surfing The p53 Network, *Nature*, **408**(6810): 307-310.

Wagner E.F. And Nebreda Á.R., 2009. Signal Integration by JNK and P38 MAPK Pathways in Cancer Development, *Nature Reviews Cancer*, **9**(8): 537-549.

Wang Z., Chandrasena E.R., Yuan Y., Peng K.-W., Van Breemen R.B., Thatcher G.R., *et al.*, 2010. Redox Cycling of Catechol Estrogens Generating Apurinic/Apyrimidinic Sites and 8-Oxo-Deoxyguanosine Via Reactive Oxygen Species Differentiates Equine and Human Estrogens, *Chemical Research in Toxicology*, **23**(8): 1365-1373.

Wiknjosastro, H. 2007. *Ilmu Kandungan*. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Jakarta.

Willcox J.K., Ash S.L. and Catignani G.L., 2004. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**(4): 275-295.

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta. Kanisius.

Winkel-Shirley B., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology, *Plant Physiology*, **126**(2): 485-493.

Winkel-Shirley B., 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology, *Plant Physiology*, **126**(2): 485-493.

Yang H., Xie Y., Yang D. and Ren D., 2017. Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Granulosa Cells Involves JNK, P53 and Puma, *Oncotarget*, **8**(15): 25310.

Yörük P., Uygur M., Erenus M. and Eren F., 2006. The Role of Vaginal Maturation Value Assessment in Prediction of Vaginal pH, Serum FSH and E2 Levels.

Yoshimoto M., Okuno S., Yamaguchi M. and Yamakawa O., 2001. Antimutagenicity of Deacylated Anthocyanins in Purple-Fleshed Sweetpotato, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**(7): a1652-1655.

Yoshimura S.-I., Banno Y., Nakashima S., Takenaka K., Sakai H., Nishimura Y., *et al.*, 1998. Ceramide Formation Leads to Caspase-3 Activation During



Hypoxic PC12 Cell Death: Inhibitory Effects of Bcl-2 on Ceramide Formation and Caspase-3 Activation, *Journal of Biological Chemistry*, **273**(12): 6921-6927.

Young I. and Woodside J., 2001. Antioxidants in Health and Disease, *Journal of Clinical Pathology*, **54**(3): 176-186.

Zaino R., and Robboy S.J., 2002. Diseases of The Vagina. Blausteins Pathology of The Female Genital Tract, Ed. RJ Kurman. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

Zaino R.J., Nucci M. and Kurman R.J., 2011. Diseases of The Vagina, in *Blaustein's Pathology of The Female Genital Tract*, Springer, 105-154.

Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H. and Winoto A., 1998. Fas-Mediated Apoptosis and Activation-Induced T-Cell Proliferation are Defective in Mice Lacking FADD/Mort1, *Nature*, **392**(6673): 296.

Zhao, J.G, Yan, Q.Q, Lu, L.Z., Zhang, Y.Q. 2013. In Vivo Antioxidant, Hypoglycemic, and Anti-Tumor Activities of Anthocyanins Extract from Purple Sweet Potato, *Nutr. Res. Pract.* **7**(5): 359-365.

Zheng H., Harlow S.D., Kravitz H.M., Bromberger J., Buysse D.J., Matthews K.A., et al., 2015. Actigraphy-Defined Measures of Sleep and Movement Across The Menstrual Cycle in Midlife Menstruating Women: SWAN Sleep Study, *Menopause (New York, NY)*, **22** (1): 66.



Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan 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. 249 / EC / KEPK – S2 / 07 / 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 Antosianin Ubi Jalar (*Pomoea batatas L*) Varietas Ungu terhadap Ekspresi p53, Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina, Indeks Apoptosis Sel Epitel Endometrium, Ekspresi Fas, Ketebalan Endometrium, Penurunan Kadar Interleukin 6 Serum, dan Rasio Jumlah Sel Osteoklas Osteoblas Tulang Femur Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Post Ovariektomi.

PENELITI UTAMA : Cucun Setya Ferdina
Meirna Eka Fitriasnani
Siska Nawang Ayunda Maqfiro

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

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Biokimia 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 (Amandemen Protokol)



Lampiran 2 Hasil Uji Kadar Antosianin

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS DAN INSTRUMENTASI
JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI MALANG
JL. SOEKARNO HATTA NO. 09 PO. BOX 04 MALANG 65141

SURAT KETERANGAN HASIL ANALISIS SAMPEL

Nama Pemesan : Cucun Setya Ferdina
Alamat : S-2 Kebidanan UB
Tanggal masuk : 17 Mei 2017
Jenis Sampel : Ubi Jalar Ungu

REKAPITULASI HASIL ANALISIS SAMPEL ANTHOCYANIN

NO	PARAMETER	KADAR (ppm)	METODE
1	Total Anthocyanin	447.49	UV-VIS Spectrometri

Demikian Surat Keterangan Hasil Analisis Sampel ini dibuat.

Malang, 17 Juni 2017

Pelaksana



Kalawan



Lampiran 3 Hasil Penghitungan Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Hasil Penghitungan Ketebalan Epitel, Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

Kelompok perlakuan	Kode sampel	Ketebalan Sel Epitel (µm)	Indeks apoptosis (%)	Ekspresi p53 (%)
K	1	24.56	35.29	27.45
	2	23.80	32.69	30.77
	3	24.80	40.38	32.69
	4	22.95	32.08	28.30
	5	25.13	30.19	24.53
	6	24.48	32.00	32.00
P1	1	27.31	34.00	22.00
	2	28.47	33.33	21.57
	3	26.78	32.65	18.37
	4	27.08	25.00	13.46
	5	29.03	40.38	11.54
	6	27.48	30.00	20.00
P2	1	28.55	20.75	16.98
	2	29.12	24.53	20.75
	3	26.42	26.92	15.38
	4	28.31	26.53	14.29
	5	26.52	19.23	21.15
	6	27.59	27.45	17.65
P3	1	36.24	20.75	7.55
	2	39.89	17.65	5.88
	3	32.98	23.53	9.80
	4	33.13	18.87	5.66
	5	35.03	15.38	11.54
	6	37.23	19.61	31.22



Lampiran 4 Hasil Uji Statistik

Hasil Uji Statistik

A. Hasil Uji Statistik Ketebalan Epitel Vagina Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Ovariektomi

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
k	.263	6	.200*	.918	6	.489
p1	.263	6	.200*	.904	6	.400
p2	.200	6	.200*	.915	6	.468
p3	.174	6	.200*	.939	6	.647

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.141	3	20	.020

3. Uji Komparasi

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
k	6	24.2867	.78871	.32199	23.4590	25.1144
p1	6	27.6917	.87094	.35556	26.7777	28.6057
p2	6	27.7517	1.10796	.45232	26.5889	28.9144
p3	6	35.7500	2.63157	1.07433	32.9883	38.5117
Total	24	28.8700	4.53752	.92622	26.9540	30.7860



ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	425.883	3	141.961	59.564	.000
Within Groups	47.667	20	2.383		
Total	473.550	23			

Multiple Comparisons

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
k	p1	-3.40500*	.89132	.001	-5.2643	-1.5457
	p2	-3.46500*	.89132	.001	-5.3243	-1.6057
	p3	-11.46333*	.89132	.000	-13.3226	-9.6041
p1	k	3.40500*	.89132	.001	1.5457	5.2643
	p2	-.06000	.89132	.947	-1.9193	1.7993
	p3	-8.05833*	.89132	.000	-9.9176	-6.1991
p2	k	3.46500*	.89132	.001	1.6057	5.3243
	p1	.06000	.89132	.947	-1.7993	1.9193
	p3	-7.99833*	.89132	.000	-9.8576	-6.1391
p3	k	11.46333*	.89132	.000	9.6041	13.3226
	p1	8.05833*	.89132	.000	6.1991	9.9176
	p2	7.99833*	.89132	.000	6.1391	9.8576

B. Hasil Uji Statistik Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
K	.284	6	.143	.859	6	.187
P1	.221	6	.200*	.961	6	.829
P2	.246	6	.200*	.861	6	.193
P3	.133	6	.200*	.994	6	.997

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.357	3	20	.785

3. Uji Komparasi

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K	6	33.7717	3.63247	1.48295	29.9596	37.5837
P1	6	32.5600	5.05043	2.06183	27.2599	37.8601
P2	6	24.2350	3.46684	1.41533	20.5968	27.8732
P3	6	19.2983	2.77003	1.13086	16.3914	22.2053
Total	24	27.4663	7.06840	1.44283	24.4815	30.4510



ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	857.162	3	285.721	19.572	.000
Within Groups	291.969	20	14.598		
Total	1149.131	23			

Multiple Comparisons

LSD

(I) kelompok pengamatan		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
K	P1	1.21167	2.20593	.589
	P2	9.53667*	2.20593	.000
	P3	14.47333*	2.20593	.000
P1	K	-1.21167	2.20593	.589
	P2	8.32500*	2.20593	.001
	P3	13.26167*	2.20593	.000
P2	K	-9.53667*	2.20593	.000
	P1	-8.32500*	2.20593	.001
	P3	4.93667*	2.20593	.037
P3	K	-14.47333*	2.20593	.000
	P1	-13.26167*	2.20593	.000
	P2	-4.93667*	2.20593	.037

C. Hasil Uji Statistik Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
K	.183	6	.200 [*]	.945	6	.697
P1	.217	6	.200 [*]	.880	6	.270
P2	.197	6	.200 [*]	.922	6	.522
P3	.226	6	.200 [*]	.910	6	.436

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.310	3	20	.299

3. Uji Komparasi

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K	6	29.2900	3.10219	1.26646	26.0345	32.5455
P1	6	17.8233	4.35976	1.77987	13.2480	22.3986
P2	6	17.7000	2.78339	1.13632	14.7790	20.6210
P3	6	8.3717	2.38140	.97220	5.8725	10.8708
Total	24	18.2963	8.15577	1.66479	14.8524	21.7401



ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1319.634	3	439.878	41.844	.000
Within Groups	210.247	20	10.512		
Total	1529.882	23			

Multiple Comparisons

LSD

(I) kelompok pengamatan	(J) kelompok pengamatan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
K	P1	11.46667*	1.87193	.000
	P2	11.59000*	1.87193	.000
	P3	20.91833*	1.87193	.000
P1	K	-11.46667*	1.87193	.000
	P2	.12333	1.87193	.948
	P3	9.45167*	1.87193	.000
P2	K	-11.59000*	1.87193	.000
	P1	-.12333	1.87193	.948
	P3	9.32833*	1.87193	.000
P3	K	-20.91833*	1.87193	.000
	P1	-9.45167*	1.87193	.000
	P2	-9.32833*	1.87193	.000



D. Hasil Uji Korelasi Ketebalan Epitel dan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin.

Correlations

		ketebalan epitel	indeks apoptosis
ketebalan epitel	Pearson Correlation	1	-.703**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
indeks apoptosis	Pearson Correlation	-.703**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

E. Hasil Uji Korelasi Ketebalan Epitel dan Ekspresi p53 Sel Epitel Vagina pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariectomi Setelah Pemberian Antosianin.

Correlations

		ketebalan epitel	ekspresi p53
ketebalan epitel	Pearson Correlation	1	-.845**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
ekspresi p53	Pearson Correlation	-.845**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24



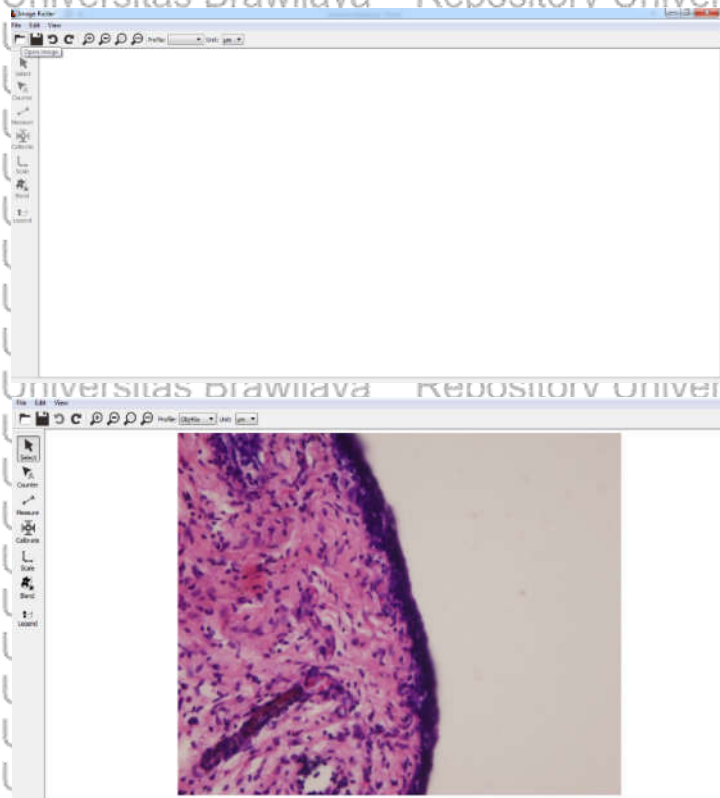
Lampiran 5 Cara Penggunaan Software Image Raster

Cara Penggunaan Software Image Raster

1. Buka software Image Raster

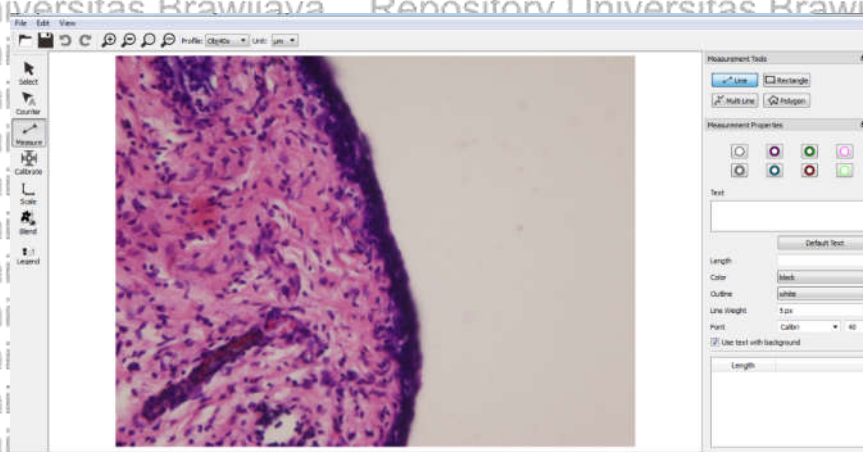
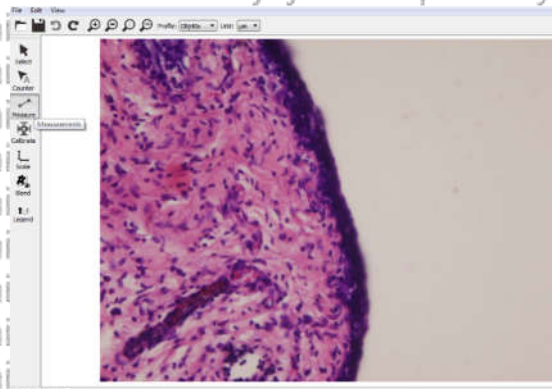


2. Buka gambar yang akan dilakukan pengukuran, dengan cara klik menu open hingga muncul gambar yang akan diukur.

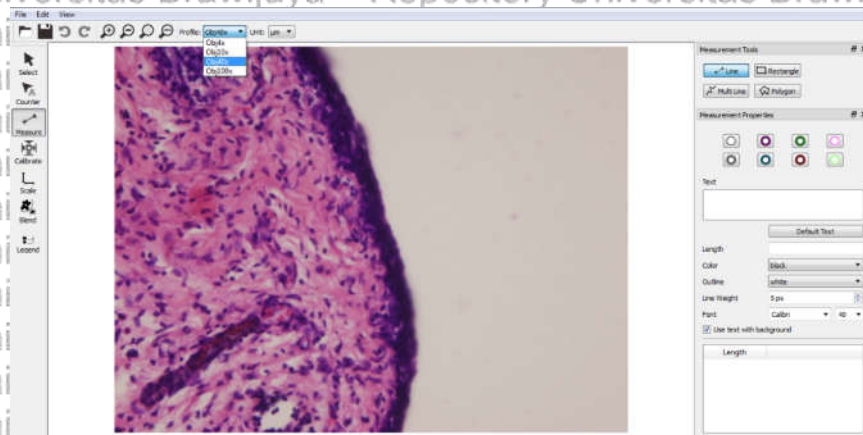




3. Klik pada menu **measure** pada menu sisi kiri, kemudian akan muncul pilihan cara pengukuran pada sisi kanan.



4. Saat mengukur, pastikan fitur **profile** telah disesuaikan dengan perbesaran objektif mikroskop yang digunakan saat mencuplik gambar yang sedang diukur.





5. Ukur panjang sesuai prosedur penelitian, yaitu ketebalan epitel vagina diukur dengan batas lamina propria.

6. Kemudian simpan gambar



Lampiran 6 Prosedur Teknik Ovariektomi, Pengukuran Indeks Apoptosis dan Ekspresi p53

1. Prosedur Ovariektomi

- a. Tikus ditimbang dengan timbangan digital untuk menentukan dosis agen anestesi.
- b. menyiapkan larutan anestesi pada tikus dengan campuran : acepromazine (0,5-2,5 mg/kgBB) dan ketamin (50-150 mg/kgBB), diambil dalam spuit disposable insulin dengan volume larutan 0,2 ml.
- c. Tikus dianestesi di daerah paha bagian dalam / luar secara intra muscular. Sekitar 5 menit, tikus akan tertidur (\pm 45 menit).
- d. Meletakkan tikus di atas papan kayu yang sebelumnya telah dilapisi kain dengan abdomen menghadap ke atas, lalu keempat kaki ditancapkan dengan jarum.
- e. Persiapan lapang operasi pada abdomen tikus. Rambut abdomen dicukur di area bedah \pm seluas 4 cm², kemudian oleskan etanol.
- f. Lakukan sebuah insisi kecil tegak lurus peritoneal (*transverse peritoneal*) sepanjang 0,4 - 0,6 cm dengan pisau *scalpel* ukuran 11 di pertengahan abdomen dan secara ringan arahkan ke sisi kanan mendekati putting susu kedua kanan.
- g. Setelah mencapai kavum peritoneal, jaringan adiposa ditarik sampai tuba uterina kanan dan ovarium teridentifikasi. Lakukan juga untuk tuba dan ovarium kiri. Letakkan masing – masing organ pada duk steril.
- h. Lakukan pengikatan pada daerah distal tuba uterus dan potong ovarium. Lakukan pada ovarium sisi sebaliknya.



i. Letakkan ovarium pada botol sampel rendam dengan larutan buffer formalin 10% dan lakukan pemeriksaan di Laboratorium Patologi Anatomi untuk memastikan apakah benar yang diambil adalah organ ovarium.

j. Masukkan kembali tuba ke dalam kavum peritoneal. Lalu jahit kembali ke dalam 2 lapisan (otot dan kulit) dengan catgut. Untuk peritoneum dan otot menggunakan benang yang mudah diabsorpsi, sedangkan untuk kulit menggunakan benang non-absorpsi.

k. Olesi bekas jahitan dengan povidon iodine.

l. Lakukan perawatan dengan teknik aseptik pada tikus post ovariektomi.

m. Tikus post ovariektomi ditempatkan pada kandang tunggal yang lalu diberi makan dan botol minum. Tikus yang telah sadar akan sulit bergerak sehingga makanan dan botol minum diberi berdekatan dengan posisi mulut.

n. Perlakuan pasca ovariektomi

Amati luka pada tikus rutin setiap hari. Berikan antibiotik pada luka operasi tikus untuk mencegah terjadinya infeksi. Berikan makanan dan minuman tikus secara teratur dan perhatikan kebersihan kandang tikus.

(Meiyanto, 2000.; Khajuria *et al*, 2012)

2. Prosedur pengukuran ekspresi p53 menggunakan teknik imunohistokimia.

a. Persiapan jaringan

Slide dipanaskan pada hot plate pada suhu 60°C selama 45 menit.

1) Deparafinasi yaitu menghilangkan paraffin yang menempel pada slide, dengan cara mencucinya dengan xylol sebanyak 3 kali masing – masing selama 3 menit.

2) Rehidrasi

Merendam slide ke dalam larutan ini secara berurutan :

a) Etanol absolut (2 x 10 menit)



b) Etanol 90% (1 x 5 menit)

c) Etanol 80% (1 x 5 menit)

d) Etanol 70% (1 x 5 menit)

e) Aquades steril (3 x 5 menit)

3) Merendam slide dalam chamber yang berisi buffer sitrat dengan pH 6,0 kemudian memanaskan slide dalam *waterbath* dengan suhu 95°C selama 20 menit kemudian didinginkan selama 20 menit. Selanjutnya mencuci slide dengan larutan PBS sebanyak 3x dalam 5 menit

b. Pewarnaan *imunostaining*

1) Membersihkan pinggiran slide dengan tissue tanpa mengenai jaringan, kemudian melakukan blocking peroksidase endogen untuk mengurangi bias dengan menutup protein yang bukan merupakan protein target. Hal ini dilakukan dengan cara :

a) Menetes H₂O₂ 3% dalam methanol selama 20 menit.

b) Inkubasi suhu ruang selama 15 menit.

c) Mencuci slide dengan larutan PBS 1x5 menit dan 2x2 menit.

2) Melakukan *blocking unspezifik* protein, dengan cara :

a) Menetes slide dengan background sniper, lalu menginkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit.

b) Mencuci slide dengan larutan PBS 1x5 menit, dan 2x2 menit.

3) Melakukan inkubasi antibodi primer, dengan cara :

a) Meneteskan antibodi primer yang dilarutkan dalam buffer PBS, BSA 0,2% Triton X-100 0,25%.

b) Menginkubasi overnight pada suhu 4°C.

c) Mengeluarkan dari tempat inkubasi ke dalam suhu ruang.

d) Mencuci slide dengan larutan PBS 1x5 menit, dan 2x2 menit.



4) Melakukan inkubasi antibodi sekunder, dengan cara :

a) Meneteskan antibodi sekunder lalu diinkubasi dalam suhu ruang selama 60 menit. Slide diletakkan di dalam chamber yang bagian bawahnya sudah dilapisi tissue dan aquades agar tetap lembab dan tidak terjadi proses penguapan.

b) Mencuci slide dengan larutan PBS 1x5 menit, dan 2x2 menit.

5) Menginkubasi SA-HRP dengan cara :

a) Meneteskan SA-HRP lalu diinkubasi dalam suhu ruang selama 40 menit.

b) Mencuci slide dengan larutan PBS 1x5 menit, dan 2x2 menit.

c) Bilas dengan aquades sebanyak 3 – 4 kali.

6) Aplikasi cromagen DAB untuk memunculkan warna, dengan cara :

a) Meneteskan dengan DAB (DAB chromagen : DAB buffer = 1 : 40).

b) Menginkubasi dalam suhu ruang selama 1 – 10 menit.

c) Bilas dengan aquades 3x5 menit.

c. Counterstaining

Menggunakan Lilis modifier, untuk memberi warna.

1) Mengencerkan Lilis modifier dengan air bersih dengan perbandingan 1 : 2 atau 1 : 10.

2) Meneteskan Lilis modifier lalu diinkubasi selama 1 menit. Kemudian teteskan 3 tetes aquades di atas slide yang sudah diberi Lilis modifier, inkubasi selama 6 menit dalam suhu ruang.

3) Bilas dengan aquades.



d. *Mounting*

Menggunakan entellan untuk melindungi sampel sebelum diamati, dengan cara meneteskan entellan pada slide lalu dikeringkan. Setelah itu menutup slide dengan *cover glass*.

e. Pengamatan ekspresi p53 di epitel vagina

Mengamati slide di bawah mikroskop Nikon E100 dengan perbesaran 1000x. Sel yang berwarna coklat merupakan sel yang mengekspresikan p53.

3. Prosedur pengukuran indeks apoptosis menggunakan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated DUTP Nick and Labeling*)

a. Lakukan deparafinasi preparat (blok paraffin) dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing – masing 3 menit.

b. Rehidrasi preparat dengan menggunakan

- 1) Etanol 100% (2 menit)
- 2) Etanol 95% (2 menit)
- 3) Etanol 70% (1 menit)
- 4) Air selama (1 menit)

c. Rehidrasi preparat dengan aquades steril.

d. Tetesi preparat dengan 50 μ l TUNEL labeling mix (terdiri dari 5 μ l terminal deoxynucleotidyl transferase dan 45 μ l HRP-dUTP, inkubasi selama 40 menit pada suhu ruang.

e. Cuci preparat dengan PBS (Phosphate Buffer Saline) sebanyak 3 x 5 menit.

f. Aplikasi cromagen DAB untuk memunculkan warna, dengan cara :

- 1) Meneteskan dengan DAB (DAB chromagen : DAB buffer = 1 : 40)
- 2) Menginkubasi dalam suhu ruang selama 1 – 10 menit.
- 3) Bilas dengan aquades 3x5 menit.



g. *Counterstaining*

Menggunakan Lilis modifier, untuk memberi warna.

- 1) Mengencerkan Lilis modifier dengan air bersih dengan perbandingan 1 : 2 atau 1 : 10.
- 2) Meneteskan Lilis modifier lalu diinkubasi selama 1 menit. Kemudian teteskan 3 tetes aquades di atas slide yang sudah diberi Lilis modifier, inkubasi selama 6 menit dalam suhu ruang.
- 3) Bilas dengan aquades.

h. *Mounting*

Menggunakan entellan untuk melindungi sampel sebelum diamati, dengan cara meneteskan entellan pada slide lalu dikeringkan. Setelah itu menutup slide dengan *cover glass*.

f. Pengamatan apoptosis sel di epitel vagina

Mengamati slide di bawah mikroskop Nikon E100 dengan perbesaran 1000x. Sel yang berwarna coklat merupakan sel yang apoptosis



Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian



Pembuatan Pakan



Pemberian pakan pada tikus



Penggantian Sekam



Penimbangan Tikus



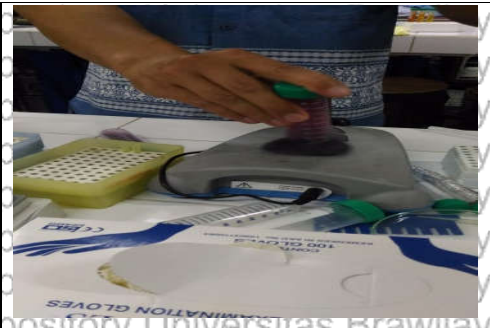
Ovariektomi



Post ovariektomi



Penimbangan antosianin



Pengenceran antosianin



Antosianin yang telah diencerkan



Penyondean antosianin



Pembedahan



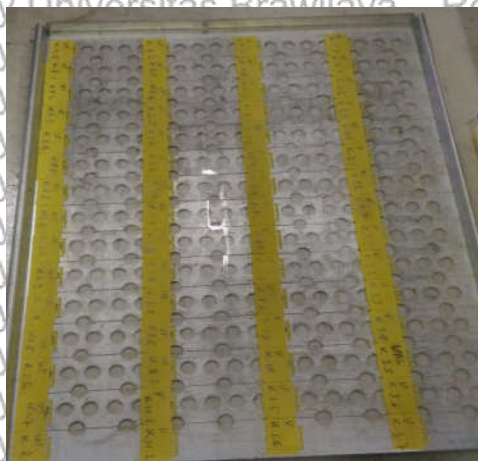
Perendaman organ dalam larutan buffer formalin 10%



Tunnel Assay Kit



Imunostaining Kit



Persiapan pengovenan slide



Inkubasi DAB



Proses counterstaining



Proses mounting



Lampiran 9 Surat Keterangan Plagiasi



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 : 238/UN10.7/BPJ/VIII/2017

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

Judul : Pengaruh Antosianin Terhadap Ekspresi P53 dan Indeks Apoptosis Sel Epitel Vagina Pada Tikus Ovariektomi
Penulis : Cucun Setya Ferdina
NIM : 156070400111029
Jumlah Halaman : 77
Jenis Artikel : Tesis (PS S2 Kebidanan)
Kemiripan : 5 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 21 Agustus 2017

Ketua Badan Penerbitan Jurnal FKUB



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes

NIP 19751125 200501 2 001