

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI DIET TINGGI LEMAK DAN
MSG TERHADAP JUMLAH FOLIKEL *de Graaf* DAN ATRETIK PADA
OVARIUM TIKUS *Rattus novergicus* GALUR WISTAR BETINA**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| Halaman Judul ----- | i |
| Halaman Pengesahan----- | ii |
| Kata Pengantar ----- | iii |
| Halaman Abstrak ----- | v |
| Halaman <i>Abstract</i> ----- | vi |
| Daftar Isi ----- | vii |
| Daftar Tabel----- | x |
| Daftar Gambar ----- | xi |
| Daftar Singkatan----- | xii |
| BAB 1 PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang ----- | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah----- | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian ----- | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian----- | 4 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 <i>Monosodium Glutamate</i> (MSG) ----- | 6 |
| 2.1.1 Definisi ----- | 6 |
| 2.1.2 Metabolisme MSG----- | 7 |
| 2.1.3 Efek <i>Monosodium Glutamate</i> (MSG) ----- | 8 |
| 2.2 Diet Tinggi Lemak ----- | 12 |
| 2.2.1 Definisi dan Komposisi ----- | 12 |
| 2.2.2 Efek Diet Tinggi Lemak pada Sistem Reproduksi ----- | 13 |
| 2.3 Ovarium ----- | 15 |
| 2.3.1 Anatomi Ovarium ----- | 15 |
| 2.3.2 Siklus Ovarium ----- | 16 |
| 2.4 Tikus <i>Rattus Novergicus</i> ----- | 25 |
| 2.4.1 Data Biologi Umum Tikus----- | 26 |
| 2.4.2 Siklus Reproduksi Tikus ----- | 27 |
| 2.4.3 Histologi Folikel Ovarium ----- | 30 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN | |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian ----- | 32 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian ----- | 34 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Rancangan Penelitian ----- | 35 |
| 4.2 Populasi dan Sampel ----- | 35 |
| 4.2.1 Kriteria Inklusi ----- | 35 |
| 4.2.2 Kriteria Eksklusi----- | 36 |
| 4.3 Variabel Penelitian----- | 37 |

| | |
|---|----|
| 4.3.1 Variabel Tergantung ----- | 37 |
| 4.3.2 Variabel Bebas ----- | 37 |
| 4.3.3 Variabel Kendali ----- | 37 |
| 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian ----- | 38 |
| 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian ----- | 38 |
| 4.5.1 Bahan ----- | 38 |
| 4.5.2 Alat ----- | 39 |
| 4.6 Definisi Istilah/Operasional ----- | 40 |
| 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data ----- | 41 |
| 4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba ----- | 41 |
| 4.7.2 Proses Pemeliharaan Hewan Coba ----- | 41 |
| 4.7.3 Pembuatan Diet Normal ----- | 42 |
| 4.7.4 Pembuatan Diet Tinggi Lemak ----- | 43 |
| 4.7.5 Pemberian MSG ----- | 44 |
| 4.7.6 Penentuan Fase Proestrus ----- | 45 |
| 4.7.7 Prosedur Pengerjaan Preparat Histo Patologi ----- | 46 |
| 4.7.8 Pengamatan Histologi Ovarium Tikus dan Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium ----- | 47 |
| 4.8 Analisis Data ----- | 48 |
| 4.9 Skema Alur Penelitian ----- | 49 |
| BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA | |
| 5.1 Sediaan Ovarium Untuk Mengamati Folikel <i>de Graaf</i> dan Atretik ----- | 51 |
| 5.2 Data Hasil Penelitian ----- | 53 |
| 5.2.1 Analisis Uji Normalitas dan Homogenitas Data ----- | 53 |
| 5.2.2 Rerata Jumlah Folikel <i>de Graaf</i> dan Atretik Pada Ovarium Tikus ----- | 54 |
| BAB 6 PEMBAHASAN | |
| 6.1 Pembahasan ----- | 58 |
| BAB 7 PENUTUP | |
| 7.1 Kesimpulan ----- | 63 |
| 7.2 Saran ----- | 63 |
| DAFTAR PUSTAKA ----- | 64 |
| Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan ----- | 69 |
| Lampiran 2. Surat Keterangan Laik Etik ----- | 70 |
| Lampiran 3. Formulir Etik Penelitian Kesehatan ----- | 71 |
| Lampiran 4. Tabel Jumlah Folikel <i>de Graaf</i> dan Atretik ----- | 75 |
| Lampiran 5. Tabel Uji Asumsi Normalitas Folikel <i>de Graaf</i> ----- | 76 |



| | |
|--|----|
| Lampiran 6. Tabel Uji Asumsi Normalitas Folikel Atretik ----- | 76 |
| Lampiran 7. Tabel Uji Asumsi Homogenitas Folikel <i>de Graaf</i> ----- | 76 |
| Lampiran 8. Tabel Uji Asumsi Homogenitas Folikel Atretik ----- | 76 |
| Lampiran 9. Tabel Hasil Pengujian ANOVA Jumlah Folikel <i>de Graaf</i> ----- | 76 |
| Lampiran 10. Tabel Hasil Pengujian ANOVA Jumlah Folikel Atretik ----- | 77 |
| Lampiran 11. Tabel Uji Tukey HSD Jumlah Folikel <i>de Graaf</i> ----- | 77 |
| Lampiran 12. Tabel Homogeneous Subsets Folikel <i>de Graaf</i> ----- | 78 |
| Lampiran 13. Tabel Uji Tukey HSD Jumlah Folikel Atretik ----- | 78 |
| Lampiran 14. Tabel <i>Homogeneous Subsets</i> Folikel Atretik ----- | 79 |
| Lampiran 15. Dokumentasi Selama Penelitian ----- | 80 |



ABSTRAK

Ariani, Ni Kade, Dwi. 2018. *Pengaruh Pemberian Kombinasi Diet Tinggi Lemak dan MSG Terhadap Jumlah Folikel de Graaf dan Atretik Pada Ovarium Tikus Rattus norvegicus Galur Wistar Betina.* Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed, (2) dr. Danik Agustin P., M.Kes.

Saat ini sebagian besar makanan yang dikonsumsi selain mengandung bahan penyedap seperti MSG juga mengandung lemak yang tinggi. Banyak penelitian pada hewan coba yang menunjukkan bahwa mengonsumsi MSG yang berlebihan dapat memicu beberapa penyakit kronik seperti diabetes mellitus tipe 2, penyakit kardiovaskular, efek neurotoksik pada otak, dan gangguan sistem reproduksi. Selain MSG, diet tinggi lemak juga memiliki dampak negatif pada tubuh. Penyimpanan lipid yang berlebihan dalam tubuh dapat menginduksi gangguan fungsi ovarium. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan atretik. Studi eksperimental menggunakan metode rancangan *Randomized control group post test design*, dilakukan pada tikus Wistar betina. Sampel dipilih secara acak dan dibagi dalam 6 kelompok, yaitu kontrol negatif (-), kontrol (+) 1 diet tinggi lemak (DTL), kontrol (+) 2 MSG 0,7mg/gBB, Perlakuan 1 (DTL+MSG 0,05mg/gBB), Perlakuan 2 (DTL+MSG 0,2mg/gBB), dan Perlakuan 3 (DTL+MSG 0,35mg/gBB). Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Penelitian dilakukan selama 56-61 hari. Variabel yang dihitung adalah jumlah folikel *de Graaf* dan Atretik dengan menggunakan mikroskop cahaya, perbesaran 400x. Hasil penelitian dengan menggunakan uji ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna pada penurunan jumlah folikel *de Graaf* dalam kelompok ($p=0,06$), sedangkan terdapat perbedaan yang bermakna pada peningkatan jumlah folikel atretik masing-masing kelompok ($p=0,001$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis menimbulkan efek yang sama dengan efek yang ditimbulkan oleh diet tinggi lemak saja atau MSG dosis tinggi terhadap penurunan jumlah folikel *de Graaf* dan peningkatan folikel atretik.

Kata kunci: MSG, diet tinggi lemak, folikel *de Graaf*, folikel atretik

ABSTRACT

Ariani, Ni Kade, Dwi. 2018. *Effect of Combination High Fat Diet and MSG on de Graaf and Atretic Follicles on Ovary of Rattus novercigus Strain Wistar Female Rats. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Mustika, M.Biomed, (2) dr. Danik Agustin P., M.Kes.*

Currently, most foods consumed, in addition to containing food seasonings such as MSG also contains high fat. Many experimental animal studies have shown that excessive consumption of MSG can trigger some chronic diseases such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, neurotoxic effects on the brain, and reproductive system disorders. In addition to MSG, a high-fat diet also has a negative impact on the body. Excessive lipid storage in the body may induce ovarian function impairment. This study aims to determine the effect of combining high-fat diet and MSG on the number of de Graaf and atretic follicles. The experimental study used the Randomized control group post test design, performed on female Wistar rats. The sample was randomly selected and divided into 6 groups, consists of negative control (-), control (+) 1 high-fat diet (HFD), control (+) 2 MSG 0.7mg / gBB, Treatment 1 (HFD + MSG 0.05mg / gBB), Treatment 2 (HFD + MSG 0.2mg / gBB), and Treatment 3 (HFD + MSG 0.35mg / gBB). Each group consists of 5 rats. The study was conducted for 56-61 days. The calculated variable are number of de Graaf and atretik follicles by using a light microscope, 400x magnification. Results of the study using ANOVA test showed no significant difference in decreasing number of de Graaf follicles in the group ($p = 0.06$), whereas there was a significant difference in increasing the number of atretic follicles of each group ($p = 0.001$). Conclusions of this study were the combination of a high-fat diet and various doses of MSGs having the same effect as the effects of high-fat diet alone or high-dose MSG on decreased follicular counts of de Graaf and increased atretic follicles.

Key words: MSG, high fat diet, de Graaf follicle, atretic follicle

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI DIET TINGGI LEMAK DAN MSG
TERHADAP JUMLAH FOLIKEL *de Graaf* DAN ATRETIK PADA OVARIUM
TIKUS *Rattus novergicus* GALUR WISTAR BETINA**

Oleh:

Ni Kade Dwi Ariani

NIM 145070601111030

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 26 Januari 2018

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,

dr. Nia Kurnianingsih, M. Biomed

NIK. 2011068404072001

Pembimbing-I/Penguji-II,

dr. Dewi Mustika, M. Biomed

NIK. 2016078711152001

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr. Danik Agustin P., M. Kes

NIP. 197208221998022002

Mengetahui,
Ketua Program Studi S1 Kebidanan,



Linda Ratna Wati, SST., M.Kes

NIP. 199409132014042001



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Monosodium Glutamate (MSG) merupakan salah satu zat aditif yang sering digunakan untuk menambah cita rasa makanan. MSG adalah garam sodium asam glutamat yang memiliki kandungan 78% asam glutamat, 22% sodium dan air. Melalui stimulasi dari reseptor orosensorik dan dengan meningkatkan palatabilitas terhadap makanan, penggunaan MSG dapat mempengaruhi nafsu makan secara positif, sehingga dapat menginduksi kenaikan berat badan (Eweka dkk., 2010). Menurut *Food and Drug Administrations* (FDA), MSG digolongkan ke dalam kelompok *Generally Recognized as Safe* (GRAS), dimana intake harian rata-rata MSG yaitu 550 mg/hari (J. Mustafa dkk., 2015).

Secara umum mengonsumsi MSG yang berlebihan dapat memicu beberapa penyakit kronik seperti diabetes mellitus tipe II, hipertensi, penyakit kardiovaskular, dislipidemia, kanker, dan *Chinese restaurant syndrome* (George dkk., 2015). Pemberian MSG dosis tinggi juga dapat berefek pada sistem reproduksi. Kemampuan *monosodium glutamate* dalam mengganggu sistem reproduksi adalah adanya kemungkinan bahwa MSG dapat mengubah kontrol sel-sel saraf yang berhubungan dengan sekresi hormon reproduksi melalui mekanisme pengaturan hipotalamus-hipofisis-gonad. Pemberian MSG dengan dosis 4 mg/g BB mencit menyebabkan penurunan jumlah folikel primer, sekunder, dan *de Graaf* serta peningkatan folikel atretik yang disebabkan karena

vakuolasi sel folikuler dan kongesti pembuluh darah medula ovarium (J. Mustafa dkk., 2015). Suatu penelitian yang dilakukan pada tikus *Sprague dawley* betina menunjukkan bahwa pemberian MSG 0,20g/kg BB tikus (100-150 gr) dapat menyebabkan atresia folikel di ovarium dan sedikitnya folikel yang matur (Oladipo dkk., 2015).

Selain zat aditif, salah satu faktor luar terkait dengan konsumsi makanan yang dapat berpengaruh terhadap gangguan reproduksi adalah diet tinggi lemak. Diet tinggi lemak merupakan faktor yang mengawali terjadinya sindrom metabolik seperti dislipidemia, hiperkolesterolemia, dan obesitas. Menurut Dokraz dkk. (2006) wanita dengan obesitas memiliki risiko mengalami infertilitas tiga kali lebih besar daripada wanita yang memiliki indeks massa tubuh normal. Akumulasi lemak pada *viscera* abdomen ini dapat menyebabkan peningkatan resistensi insulin. Pada sindrom resistensi insulin, tingginya insulin akan merangsang produksi androgen dengan berbagai mekanisme (Ogbuji, 2010). Insulin juga menekan kadar *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) sehingga kadar androgen bebas meningkat. Tingginya kadar androgen akan mengganggu sistem aromatase di dalam sel granulosa sehingga memicu terjadinya atresia folikel lebih dini dan menimbulkan berbagai gambaran klinis Sindrom Ovarium Polikistik (Speroff, 2011). Saat lahir hanya sekitar 2 juta folikel primer yang tersisa di ovarium, masing-masing mengandung oosit primer yang menghasilkan satu ovum. Ini berfungsi sebagai reservoir yang menjadi asal bagi semua ovum sepanjang masa subur wanita. Sehingga apabila terdapat perubahan pada jumlah folikel, ini akan berpengaruh juga terhadap fungsi reproduksi wanita (Sherwood, 2011).

Baik pemberian MSG maupun diet tinggi lemak dengan dosis atau intake tertentu sama-sama diketahui sebagai faktor yang dapat mengganggu sistem reproduksi. Penelitian untuk mengetahui efek yang dapat ditimbulkan oleh MSG terhadap sistem reproduksi pada hewan coba sudah banyak dilakukan, tetapi dosis yang digunakan adalah dosis tinggi. Sedangkan kecenderungan yang ada saat ini, kebanyakan makanan yang mengandung tinggi lemak juga mengandung MSG, sehingga ini menjadi hal yang dipertanyakan, apakah beberapa efek samping yang muncul pada manusia terjadi karena efek kandungan lemak yang tinggi atau karena kandungan MSG yang tinggi. Sehingga peneliti tertarik untuk meneliti apakah ketika dosis MSG yang digunakan lebih rendah dan saat dikonversi mendekati asupan harian manusia, jika diberikan bersama dengan diet tinggi lemak dapat berpengaruh pada sistem reproduksi. Tetapi ini juga dipengaruhi oleh seberapa sering mengonsumsi makanan dengan kandungan lemak yang tinggi maupun MSG sehingga dapat menimbulkan efek samping pada tubuh. Penelitian ini berjudul “Pengaruh Pemberian Kombinasi Diet Tinggi Lemak Dan MSG Terhadap Jumlah Folikel *de Graaf* dan Atretik Pada Ovarium Tikus *Rattus novergicus* Galur Wistar Betina” sebagai upaya pengembangan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi MSG dan diet tinggi lemak terhadap sistem reproduksi wanita, terutama dalam hal ini adalah jumlah folikel ovarium.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan folikel atretik pada ovarium tikus *Rattus novergicus* galur wistar betina?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan atretik pada ovarium tikus *Rattus novergicus* galur wistar betina.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Menghitung jumlah folikel *de Graaf* dan atretik pada ovarium tikus *Rattus novergicus* galur wistar betina yang terpapar kombinasi diet tinggi lemak dan MSG.

1.3.2.2 Membandingkan efek yang ditimbulkan pada pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dengan efek yang ditimbulkan oleh pemberian MSG atau diet tinggi lemak saja terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan atretik.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

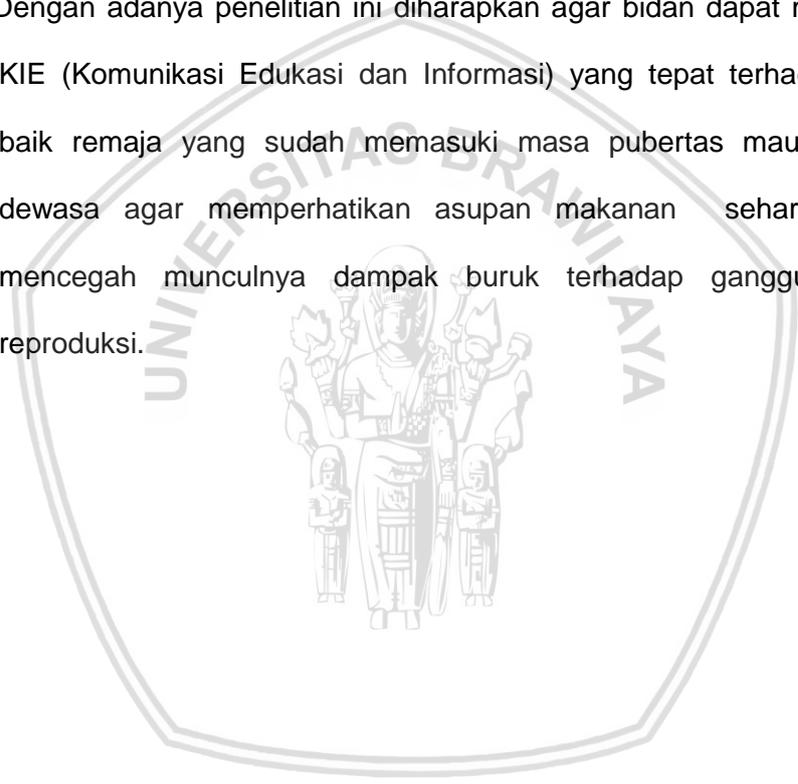
1.4.1.1 Menambah pengetahuan pembaca dalam bidang penelitian mengenai efek samping yang dapat ditimbulkan akibat pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel ovarium sistem reproduksi wanita.

1.4.1.2 Dapat digunakan sebagai literatur penunjang untuk penelitian-penelitian berikutnya mengenai efek samping pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel ovarium, khususnya di program studi S1 Kebidanan Universitas Brawijaya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1.4.2.1 Dengan adanya penelitian ini diharapkan agar masyarakat selalu waspada dan memperhatikan asupan makanan sehari-hari terutama makanan dengan kandungan lemak yang tinggi dan makanan dengan kandungan zat aditif guna mencegah munculnya dampak buruk terhadap gangguan sistem reproduksi.

1.4.2.2 Dengan adanya penelitian ini diharapkan agar bidan dapat memberikan KIE (Komunikasi Edukasi dan Informasi) yang tepat terhadap wanita, baik remaja yang sudah memasuki masa pubertas maupun wanita dewasa agar memperhatikan asupan makanan sehari-hari guna mencegah munculnya dampak buruk terhadap gangguan sistem reproduksi.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

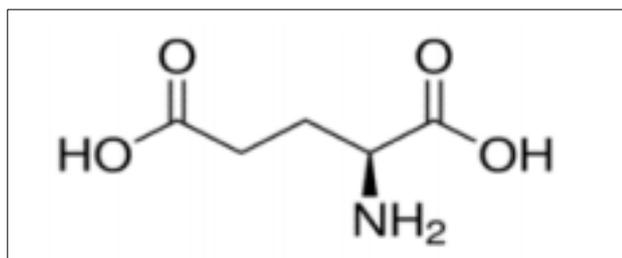
2.1 Monosodium Glutamate (MSG)

2.1.1 Definisi

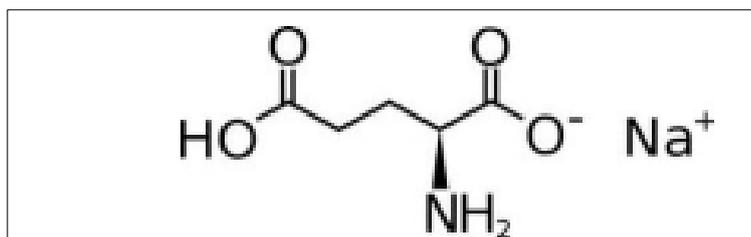
Monosodium Glutamate (MSG) merupakan salah satu zat aditif yang paling sering digunakan sebagai penambah rasa makanan. Unsur pokok yang terkandung dalam MSG diantaranya: glutamat 78,2%, Na 12,2%, H₂O 9,6% (Eweka dkk., 2010). Struktur kimia MSG dan struktur kimia *L-glutamic acid* masing-masing tertera pada gambar 2.1 dan 2.2. Adapun karakteristik MSG adalah sebagai berikut:

| | |
|---------------------|--|
| Nama IUPAC | : Sodium 2-Aminopentanedioate |
| Rumus molekul | : C ₅ H ₈ NO ₄ Na |
| Massa molar | : 169.111 g/mol |
| Tampilan | : Serbuk kristal putih |
| Titik lebur | : 232°C (450°F; 505 K) |
| Kelarutan dalam air | : 74 g/100ml |
| Dosis letal | : 15800 mg/kg (oral, pada tikus) |

(Sumber: Wikipedia)



Gambar 2.1 Struktur Kimia MSG (Wijayasekara dan Wansapala, 2017)



Gambar 2.2 Struktur Kimia *L-glutamic acid* (Wijayasekara dan Wansapala, 2017)

2.1.2 Metabolisme MSG

Tubuh manusia bereaksi terhadap glutamat yang berasal dari MSG dengan cara yang sama dengan glutamat alami. Glutamat akan diabsorpsi oleh usus melalui suatu sistem transport aktif ke dalam sel mukosa usus dimana mereka akan dimetabolisir menjadi sumber energi yang penting (Pieper dkk., 2011).

Glutamat dan aspartat akan dimetabolisme secara cepat oleh usus dan hati kemudian glutamat yang diserap ditransmisikan dengan piruvat ke dalam bentuk alanin. Alanin bersama asam amino dikarboksilat menghasilkan α -ketoglutarat atau oksaloasetat. Glutamat dan asam aspartat yang lolos dari mukosa dibawa melalui vena porta ke hati (Sukawan, 2008). Sebesar 57% dari asam amino yang diabsorpsi tubuh akan dikonversikan menjadi urea di hati, 6% diubah menjadi plasma protein, 23% asam amino diserap melalui sirkulasi darah sebagai asam amino bebas, dan sisanya sebanyak 14% disimpan sementara di dalam hati sebagai protein hati atau enzim. Pemberian MSG secara parenteral akan memberikan reaksi yang berbeda dengan pemberian per oral, karena pada pemberian secara parenteral, MSG tidak melalui usus dan vena portal. Sedangkan pada pemberian per oral, MSG akan melalui usus ke sirkulasi portal dan hati. Hati berperan untuk memetabolisme asam glutamat. Oleh karena itu,

apabila pemberian glutamat yang melebihi kemampuan kapasitas hati, akan menyebabkan peningkatan glutamat plasma (Sukawan, 2008). Pemberian MSG dengan dosis yang berlebihan baik pada manusia maupun hewan percobaan hanya meningkatkan sedikit kadar glutamat plasma. Tetapi pemberian MSG yang dilarutkan dalam air menghasilkan kadar glutamat plasma yang lebih tinggi. Glutamat yang berasal dari penambahan MSG pada makanan berkuah dimetabolisme oleh tubuh dengan sangat cepat (Sukawan, 2008).

2.1.3 Efek *Monosodium glutamate* (MSG)

Beberapa penelitian menunjukkan MSG memiliki efek yang berbeda pada sistem tubuh manusia. Efek neurotoksik pada otak, obesitas dan gangguan metabolik, *Chinese restaurant syndrome*, dan efek merugikan pada sistem reproduksi merupakan hal yang paling banyak dibahas terkait dengan asupan MSG (Husarova dan Daniela, 2013).

a. Obesitas dan Gangguan Metabolik

Penelitian yang dilakukan pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian MSG pada masa neonatal dapat menyebabkan obesitas pada hewan coba dengan menunjukkan adanya gangguan toleransi glukosa dan resistensi insulin. Hal inilah yang kemudian menimbulkan kekhawatiran tentang obesitas pada manusia yang menggunakan MSG dalam makanan. Potensi MSG dalam kaitannya dengan obesitas termasuk efeknya pada keseimbangan energi dihubungkan dengan kemampuan MSG dalam meningkatkan palatabilitas makanan dan mengganggu kaskade sinyal hipotalamus terhadap kerja leptin (He dkk., 2011).

Suatu penelitian yang dilakukan pada tikus berusia 19 minggu yang diberikan perlakuan injeksi subkutan MSG 2 mg/gBB tikus pada hari ke-2 dan 4 postnatal serta injeksi subkutan MSG 4mg/gBB tikus pada hari ke-6, 8, dan 10 postnatal, menunjukkan hasil bahwa MSG meningkatkan ekspresi mRNA pada interleukin-6, tumor nekrosis faktor-alpha, resistin, leptin dalam jaringan adiposa viseral, meningkatkan insulin, kadar leptin dalam serum, dan juga meningkatkan gangguan toleransi glukosa (Roman-Ramos dkk., 2011). Perbedaan penting antara potensial terjadi obesitas pada hewan dan manusia setelah mendapat asupan MSG yaitu pada tikus dapat terjadi obesitas karena hasil dari resistensi leptin, sedangkan pada manusia MSG dikatakan dapat mengawali terjadinya obesitas akibat dari peningkatan keinginan mengonsumsi makanan berkalori tinggi (Bannai dan Torii, 2013). Dalam penelitian oleh Collison dkk. (2010) menyebutkan pemberian kombinasi MSG dengan diet lemak trans (lemak tak jenuh) menyebabkan peningkatan *central adiposity* (penumpukan lemak di tubuh bagian bawah sekitar area perut) dan dislipidemia dibandingkan dengan mencit yang hanya diberikan diet lemak trans (lemak tak jenuh) saja atau MSG saja (Collison dkk., 2010).

Dalam beberapa penelitian yang telah dilakukan pada hewan coba menunjukkan bahwa pemberian MSG peroral dengan dosis yang mirip dengan asupan rata-rata pada manusia dan asupan untuk pengguna yang ekstrim menyebabkan gangguan pada metabolisme yang ditandai dengan peningkatan insulin, asam lemak dan trigliserida dalam serum, serta mengganggu fungsi kerja hati yang ditandai dengan peningkatan transaminase dan sintesis empedu. Namun, penerapan hasil penelitian ini untuk manusia sangat sulit karena adanya perbedaan mekanisme mana yang bisa berpotensi menyebabkan obesitas. Hal

ini disebabkan makanan manusia jauh lebih beragam dan dikombinasikan dengan substansi-substansi lain, sehingga perlu penelitian lebih lanjut (Husarova dan Daniela, 2013).

b. *Chinese restaurant Syndrome*

Chinese restaurant syndrome pertama kali dijelaskan lebih dari 40 tahun yang lalu. penjelasan yang sebenarnya untuk *Chinese restaurant syndrome* adalah munculnya gejala setelah 20 menit mengonsumsi makanan yang mengandung MSG, gejala yang timbul meliputi rasa terbakar di bagian belakang leher, kadang sampai ke kedua lengan dan dada, merasakan lemas dan palpitasi. Selain itu gejala yang sering muncul kemerahan, pusing, dan sinkop (Geha dkk., 2000).

c. Organ reproduksi

Penelitian mengenai efek MSG pada sistem reproduksi terbatas hanya sampai pada hewan coba. Penelitian yang dilakukan pada tikus *Swiss Albino* jantan dengan pemberian MSG 2 mg/g secara injeksi subkutan selama periode perinatal (hari ke-2, 4, 6, 8, dan 10) menyebabkan peningkatan jumlah spermatosit primer yang berada ditahap pakiten pada hari ke-75 kehidupan tikus dibandingkan dengan kelompok kontrol. Sedangkan pemberian MSG 2 mg/g pada tikus *Swiss Albino* betina dengan injeksi subkutan pada periode perinatal yang sama (hari ke-2, 4, 6, 8, dan 10 kehidupan) menunjukkan peningkatan jumlah folikel primer tanpa peningkatan pada jumlah folikel *de Graaf* di ovarium tikus pada hari ke-75 (Das dan Gosh, 2010). Penelitian lain pada tikus wistar dewasa betina yaitu dengan mencampurkan MSG pada makanan standar tikus (dosis MSG 0,04 mg/kg atau 0,08 mg/kg) menunjukkan perubahan patologis di ovarium tikus (Eweka dan Om'iniabohs, 2011), dimana MSG menyebabkan

hipertrofi seluler *theca folliculi*, kerusakan membran dasar dan vakuolasi sel-sel stroma di ovarium. Proses degeneratif dan atropik diamati pada paparan kedua dosis MSG dengan menunjukkan hasil yang lebih parah pada dosis 0,08 mg/kg (Eweka dan Om'iniabohs, 2011). Demikian pula di tuba falopi, kedua dosis MSG tersebut menyebabkan kerusakan pada membran dasar yang ditandai dengan pemisahan *endosalpinx* dari *myosalpinx*, namun pada tikus yang diberikan MSG 0,08 mg/kg, vakuolasi dan lisis sel darah merah tampak di beberapa bagian sel stroma (Eweka dkk., 2010).

Pemakaian MSG dosis besar dan lama akan memberikan efek samping yang salah satunya dapat mengakibatkan gangguan hormonal. Asam glutamat dapat dirubah menjadi asam ketoglutarat dalam hati, tetapi apabila pemberian glutamat melebihi kemampuan hati dalam memetabolismenya, menyebabkan peningkatan asam glutamat dalam darah. Ion glutamat mempengaruhi kerusakan sel neuron hipotalamus dan produksi GnRH dari hipotalamus (Uke, 2008). Gangguan GnRH ini menyebabkan gangguan kelenjar hipofise anterior untuk memproduksi FSH dan LH. FSH berfungsi untuk pematangan folikel ovarium (Walker, 2005). Menurut Burkitt (1995), pada awal perkembangan folikel sekunder zona granulosa berproliferasi dengan cepat dibawah pengaruh hormone FSH. Secara umum MSG mampu menghambat kinerja FSH, sehingga aktivitas folikel primordial menjadi folikel primer juga ikut terhambat. Gangguan hormonal akibat pengaruh MSG menyebabkan proses perkembangan folikel tidak berjalan dengan normal, sehingga sebagian besar folikel menjadi atretik (Burkitt, 1995). Pada suatu penelitian (Megawati dkk., 2005), menunjukkan bahwa jumlah korpus luteum tikus yang mendapat pemberian MSG lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak mendapat perlakuan MSG.

Penurunan jumlah korpus luteum setelah perlakuan menunjukkan terganggunya proses ovulasi. Hal ini berhubungan dengan tidak terjadinya peningkatan LH dan FSH akibat perlakuan. Oleh karena itu, sebagian besar folikel tersier yang sudah matur menjadi atretik sebelum terjadi ovulasi (Megawati dkk., 2005).

2.2 Diet Tinggi Lemak (*High Fat Diet/HFD*)

2.2.1 Definisi dan Komposisi

Diet tinggi lemak merupakan diet tinggi kolesterol yang dimodifikasi dengan formulasi khusus untuk menimbulkan keadaan dislipidemia, hiperkolesterolemik, dan obesitas pada hewan coba. Diet tinggi lemak merupakan salah satu penyebab yang dapat mengawali penumpukan massa lemak dan menyebabkan sindrom metabolik. Pada diet tinggi lemak, diet lemak ditambahkan sebagai persentase jumlah terbesar dibandingkan dengan makronutrien lainnya seperti karbohidrat dan protein. Diet tinggi lemak akan meningkatkan densitas energi makanan dan akan lebih mudah menginduksi keseimbangan energi positif yang mengakibatkan obesitas. Normalnya, kandungan lemak pada pakan normal tikus adalah 30% dari kalori total. Penelitian dalam mengembangkan tikus obesitas yang menggunakan kandungan lemak lebih tinggi dibandingkan dengan makanan normal menunjukkan kisarannya kira-kira 42%-75% (Xu, HaiYan dkk., 2008). Komposisi diet tinggi lemak tertera pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Untuk 2,5 kg Diet Tinggi Lemak Pada Tikus

| Komposisi | Jumlah |
|---------------------|---------------|
| Tepung jagung | 550 gram |
| Gula pasir | 457,5 gram |
| Korsvet | 275 gram |
| Margarin | 275 gram |
| <i>Soybean oil</i> | 130 gram |
| Gelatin | 130 gram |
| Kasein | 335 gram |
| CMC | 132,5 gram |
| Vitamin dan mineral | 25 butir |
| Air | 375 gram |
| Pewarna hijau | 20 tetes |
| Asam kolat | 5 gram |

Sumber: (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

2.2.2 Efek Diet Tinggi Lemak Pada Sistem Reproduksi

Diet tinggi lemak diketahui dapat menyebabkan pubertas dini. Menurut Feng Li dkk. (2012), pemberian diet tinggi lemak dapat mengganggu sistem endokrin yaitu meningkatkan kadar hormone LH yang dapat mempengaruhi terjadinya pubertas dini (*early onset of puberty*). Penyimpanan lipid yang berlebihan dalam tubuh dapat menginduksi gangguan fungsi ovarium seperti atresia folikel, apoptosis dan merusak steroidogenesis (Soulis, 2005). Suatu penelitian dilakukan pada tikus *Sprague dawley* yang mendapat diet tinggi lemak (penambahan 20% kalori pada pakan standar tikus) selama 18 minggu, menunjukkan hasil bahwa tikus tersebut memiliki jumlah dan persentase folikel primordial jauh lebih sedikit, tetapi jumlah dan persentase folikel atretik lebih banyak daripada kelompok kontrol. Diet tinggi lemak dihubungkan dengan aktivasi, perkembangan, dan pematangan folikel-folikel primordial lebih cepat. Oleh karena itu dapat meningkatkan terjadinya kehilangan folikel lebih banyak yang mungkin mengawali terjadinya kematangan seksual dini dan menurunkan kesuburan dengan segera (Wang dkk., 2014).

Konsumsi diet tinggi lemak dapat meningkatkan kadar trigliserida (TG), *low density lipoprotein* (LDL), dan penurunan kadar *high density lipoprotein* (HDL) tikus putih strain wistar jantan. Pada durasi 8 minggu pemberian HFD secara signifikan meningkatkan kadar TG, LDL, dan penurunan kadar HDL tikus putih strain wistar jantan (Heriansyah, 2013). Peningkatan Trigliserida dan LDL dapat mempengaruhi kadar kolesterol. LDL adalah lipoprotein yang paling banyak mengandung kolesterol (kolesterol ester 60-75%). Sebagian dari kolesterol di LDL akan dibawa ke hati dan jaringan steroidogenik lainnya seperti kelenjar adrenal, testis, dan ovarium yang mempunyai reseptor untuk kolesterol-LDL (Suyatna, 2007). Kolesterol adalah lipid amfipatik dan merupakan komponen struktural esensial pada membran dan lapisan luar lipoprotein plasma. Senyawa ini merupakan prekursor semua steroid lain di tubuh, termasuk kortikosteroid, hormon seks, asam empedu, dan vitamin D. Perubahan kadar kolesterol dapat menyebabkan gangguan hormon karena semua hormon steroid mamalia dibentuk dari kolesterol via pregnenolon melalui serangkaian reaksi yang terjadi di mitokondria atau retikulum endoplasma sel pembentuk (Murray dkk., 2009).

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan akumulasi lemak yang berlebihan pada *viscera* abdomen (*visceral fat*). Akumulasi lemak pada *viscera* abdomen ini dapat menyebabkan peningkatan resistensi insulin. Pada sindrom resistensi insulin, tingginya insulin akan merangsang produksi androgen dengan berbagai mekanisme (Ogbuji, 2010). Hiperinsulinemia akan menghambat sekresi hepar dalam menghasilkan *Insulin like Growth Factor Binding Protein-I* (IGFBP-I) dan meningkatkan *Insulin like Growth Factor-I* (IGF-I). Kelebihan insulin akan diikat oleh IGF-I yang bekerja pada sel teka untuk meningkatkan kadar LH. Insulin juga

akan mengaktifasi jalur fosforilasi serin yang bisa meningkatkan aktivitas P450c17 pada ovarium dan adrenal yang akan menstimulasi sintesis androgen. (Balen, 2005). Insulin juga menekan kadar *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) sehingga kadar androgen bebas meningkat. Tingginya kadar androgen akan mengganggu sistem aromatase di dalam sel granulosa sehingga memicu terjadinya atresia folikel lebih dini dan menimbulkan berbagai gambaran klinis Sindrom Ovarium Polikistik. Dimana seseorang yang menderita Sindrom Ovarium Polikistik memiliki tingkat androgen yang tinggi (hiperandrogenisme) (Speroff, 2011).

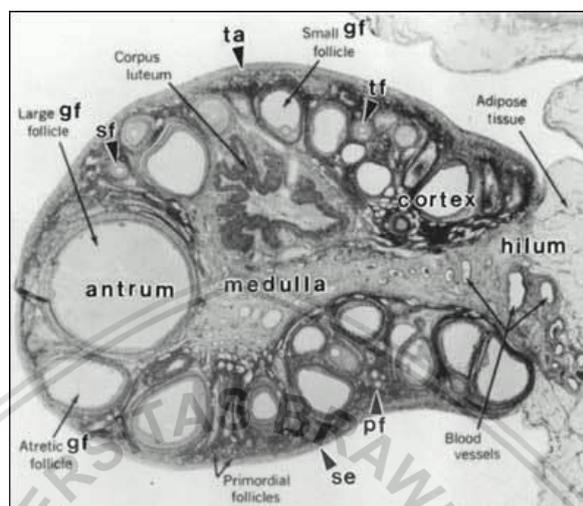
2.3 Ovarium

2.3.1 Anatomi Ovarium

Ovarium merupakan dua struktur kecil berbentuk oval, berada di samping kanan-kiri uterus. Ovarium memiliki 2 fungsi besar yang saling berhubungan yaitu gametogenesis dan steroidogenesis (Ross, 2011). Ovarium orang dewasa memiliki panjang 2-5 cm, lebar 1,5-3 cm, dan tebal 0,5-1,5 cm. Anatomi ovarium (gambar 2.3) terdiri dari:

1. Germinal Epithelium, sebuah lapisan epitel sederhana yang membungkus permukaan luar ovarium.
2. Tunika albuginea, suatu lapisan yang mengandung jaringan ikat padat iregular yang terletak dibawah germinal epithelium. Stroma, suatu area dibawah tunika albuginea dan tersusun atas korteks dan medulla. Korteks merupakan lapisan yang terletak lebih diatas, tersusun atas jaringan ikat padat dan mengelilingi medulla. Korteks mengandung folikel-folikel ovarium yang tertahan pada jaringan ikat. Batas korteks dan medulla kurang jelas.

Medulla merupakan lapisan yang terletak lebih dibawah dan tersusun dari jaringan ikat longgar, pembuluh darah, pembuluh limfatik, dan sel saraf (Ross, 2011).



Gambar 2.3 Anatomi Ovarium (Williams dan Gregory, 2012)

(Ovarium terbagi menjadi 3 bagian: daerah korteks, medula, dan hilus. Korteks terdiri dari epitel permukaan (se), tunika albuginea (ta), folikel primordial, primer (pf), sekunder (sf), graafian folikel (gf), dan korpus luteum (cl). Medula terdiri dari pembuluh darah dan saraf. Hilus mengandung arteri spiral besar dan sel *leydig* ovarium) (Williams dan Gregory, 2012).

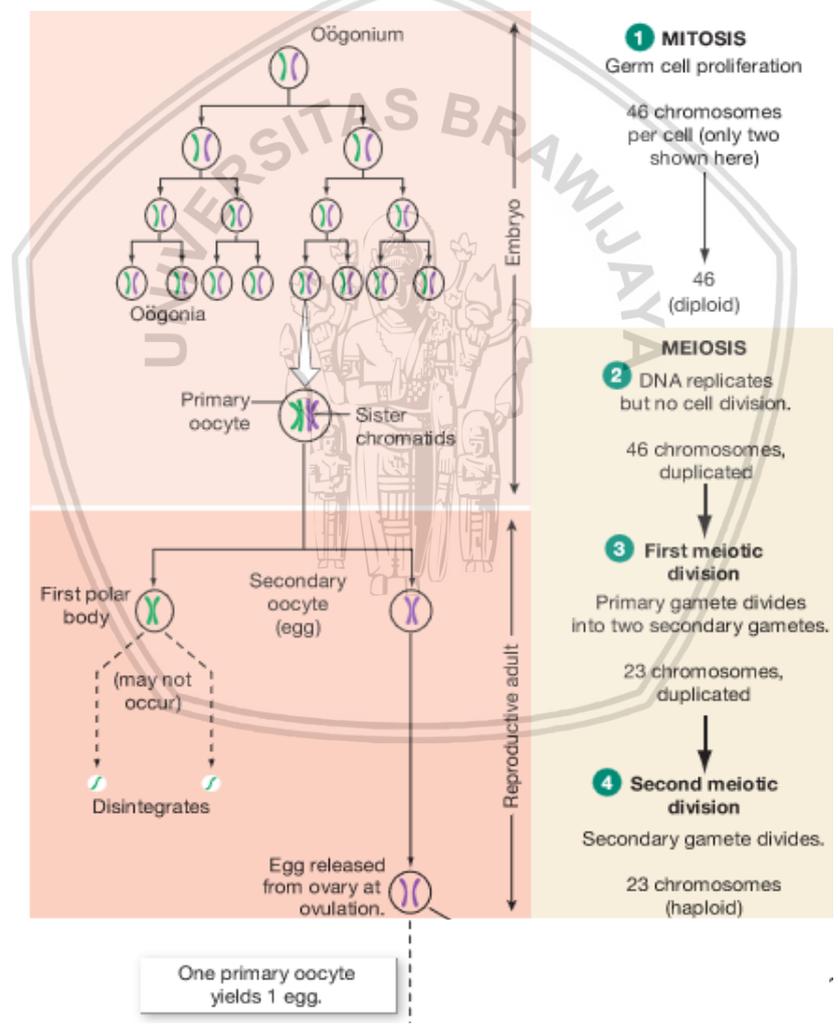
2.3.2 Siklus Ovarium

Siklus ovarium adalah serangkaian proses perubahan yang terjadi pada oosit dan folikel ovarium wanita. Siklus ini mencakup 2 dua proses yang saling berhubungan: oogenesis (proses pembentukan sel gamet pada wanita) dan folikulogenesis (proses pertumbuhan dan perkembangan folikel-folikel ovarium) (Williams dan Gregory, 2012).

1. Oogenesis

Proses gametogenesis (pembentukan sel gamet) pada wanita disebut oogenesis (gambar 2.4). Proses ini dimulai dari sel induk ovarium yang disebut dengan oogonium. Oogonium terbentuk selama perkembangan janin, dan membelah melalui pembelahan mitosis, sama seperti proses spermatogenesis

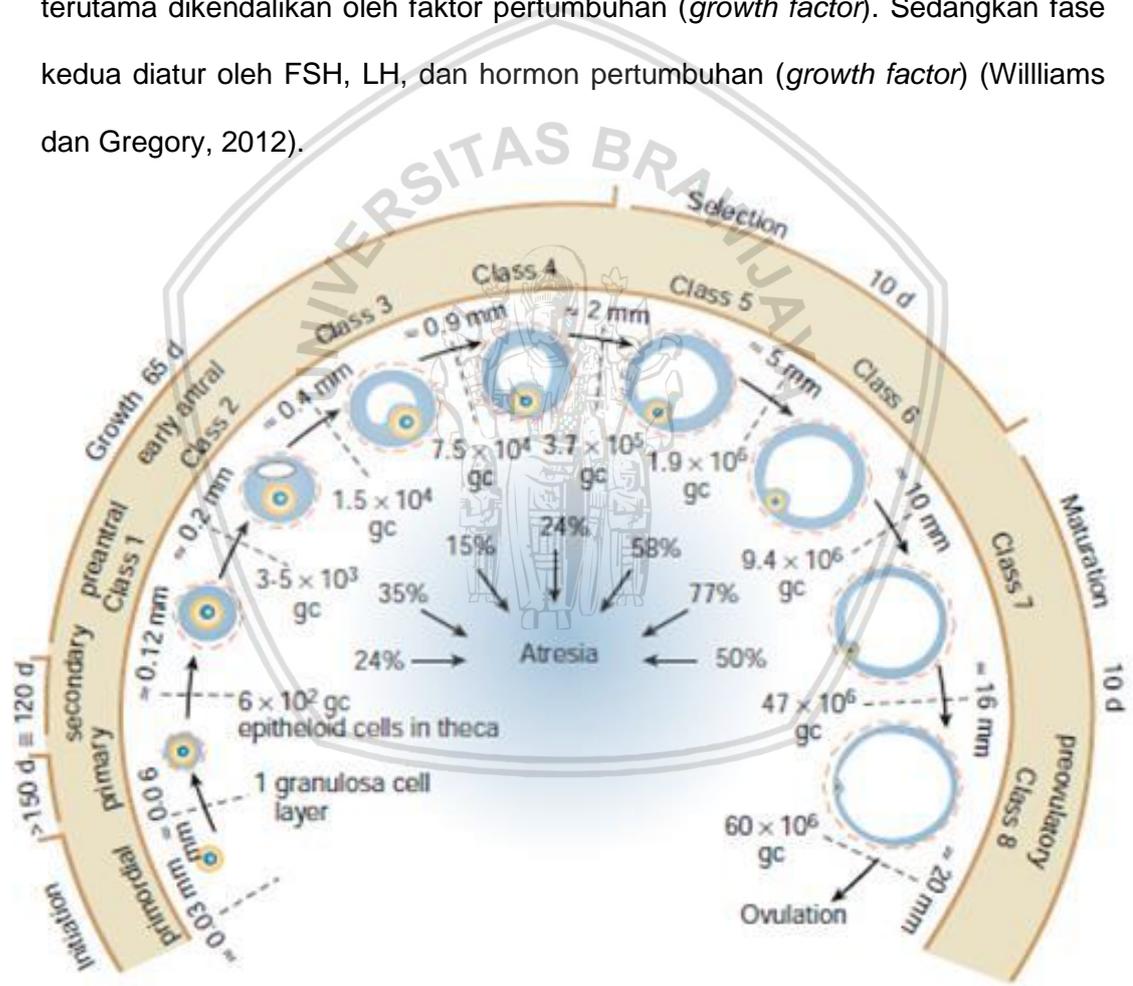
pada testis. Pada janin, oogonium akan membentuk oosit primer sebelum proses kelahiran. Kemudian oosit primer ini akan menetap pada tahap meiosis I, dan akan berlanjut ketika sudah mencapai masa pubertas dan terus berlanjut sampai wanita mencapai masa menopause (masa dimana berhentinya fungsi reproduksi wanita). Jumlah oosit primer pada bayi sekitar 1-2 juta akan semakin berkurang sampai tersisa 400.000 pada masa pubertas, dan ini semakin berkurang hingga akhir masa menopause (Williams dan Gregory, 2012).



Gambar 2.4 Proses Oogenesis (Silverthorn, 2010)

2. Konsep Dasar Folikulogenesis

Proses folikulogenesis dimulai dengan pemilihan folikel primordial ke dalam kelompok folikel yang dapat tumbuh dan berkembang, kemudian berakhir baik dengan proses ovulasi atau mati (atresia). Folikulogenesis dibedakan menjadi dua tahap yaitu fase preantral (*gonadotropin-independent phase*) dan fase antral (*gonadotropin-dependent phase*) (gambar 2.5). Fase preantral terutama dikendalikan oleh faktor pertumbuhan (*growth factor*). Sedangkan fase kedua diatur oleh FSH, LH, dan hormon pertumbuhan (*growth factor*) (Williams dan Gregory, 2012).

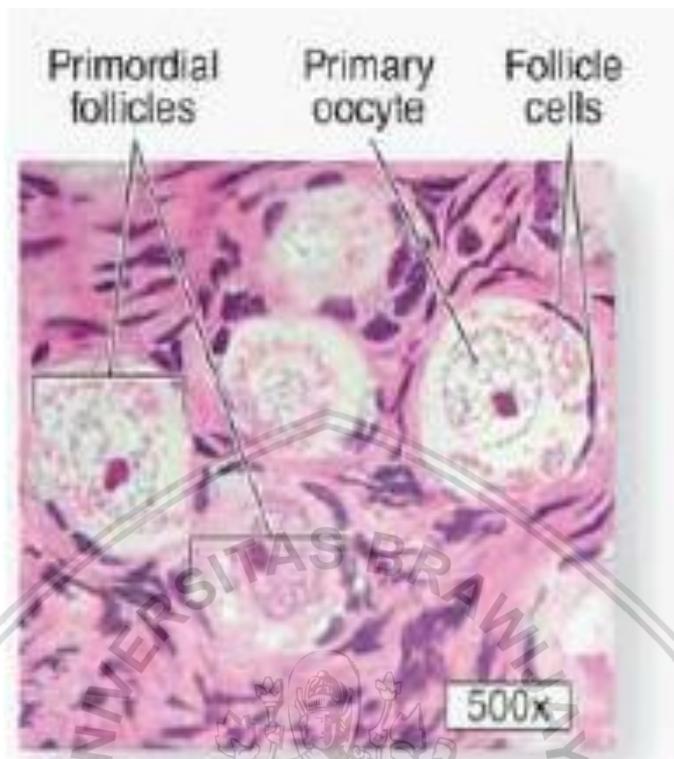


Gambar 2.5 Ilustrasi Folikulogenesis (Williams dan Gregory, 2012)

Tahap preantral (tahap Kelas 1) dibagi menjadi 3 tahap utama: tahap folikel primordial, primer, dan sekunder. Secara keseluruhan, perkembangan sebuah folikel primordial menjadi folikel sekunder yang utuh memerlukan waktu sekitar 290 hari atau sekitar 10 kali siklus menstruasi yang teratur. Fase antral dibagi menjadi 4 tahapan: tahap kecil (kelas 2, 3, 4,5), medium (kelas 6), besar (kelas 7), dan tahap preovulatori (kelas 8) atau tahap *graafian follicle*. Setelah pembentukan antrum yang terjadi pada tahap Kelas 3 (diameter folikel 0,4 mm), kecepatan pertumbuhan folikel bertambah. Interval waktu antara pembentukan antrum dan perkembangan folikel preovulatori (diameter 20 mm) adalah sekitar 60 hari atau 2 kali siklus menstruasi teratur. Folikel yang dominan memerlukan waktu 15-20 hari untuk tumbuh dan mencapai tahap preovulatori. Atresia dapat terjadi setelah melewati tahap folikel sekunder atau tahap Kelas 1, dengan insiden atresia tertinggi terjadi pada tahap kecil dan medium (Kelas 5,6, dan 7) seperti yang tertera pada gambar diatas (Williams dan Gregory, 2012).

1. Folikel Primordial

Semua folikel primordial tersusun dari sebuah oosit primer yang kecil (diameter 25 μm), menetap pada tahap diploten dari tahap meiosis, terdiri dari satu lapis sel granulosa pipih (*squamous*), dan lamina basalis (gambar 2.6). Rata-rata diameter folikel primordial manusia adalah 29 μm . Keberadaan lamina basalis menyebabkan granulosa dan oosit tidak terjadi kontak langsung dengan sel-sel lain (Mescher, 2013).



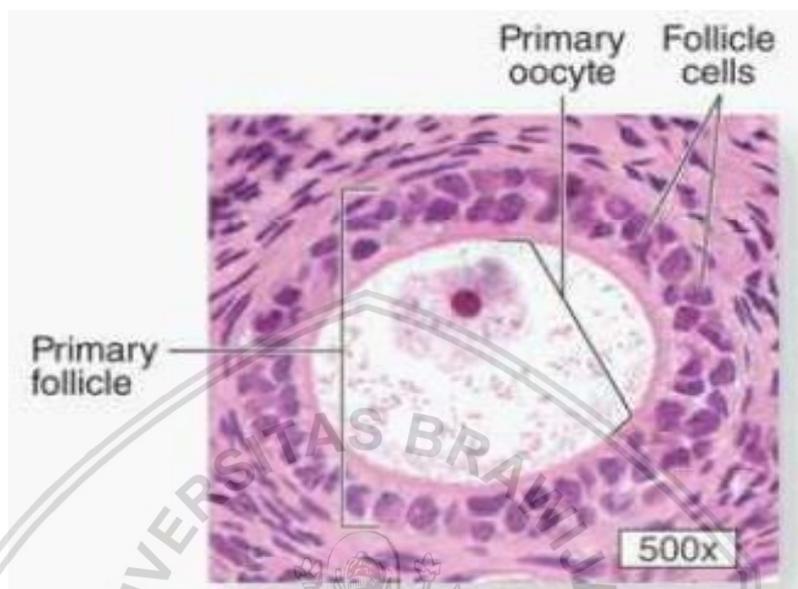
Gambar 2.6 Folikel Primordial (Mescher, 2013)

Folikel primordial terdiri dari satu lapis sel granulosa pipih (*squamous*), dan lamina basalis. Sumber: (Mescher, 2013).

2. Folikel Primer

Folikel primer terdiri dari satu atau lebih sel granulosa kuboidal yang tersusun dalam satu lapisan yang mengelilingi oosit (gambar 2.7). Perkembangan folikel primer disertai dengan perubahan pada oosit. selama periode preantral, ukuran oosit meningkat dari diameter 25-120 μm , dan berkembangnya matriks ekstraselular di sekitarnya (zona pelusida). Bersamaan dengan perubahan bentuk dan aktivitas mitosis, sel granulosa kuboidal mulai mengekspresikan reseptor FSH. Stimulator ekspresi reseptor FSH meliputi FSH itu sendiri, *activin*, siklik AMP, dan TGF. Meskipun tahap awal pertumbuhan folikel tidak bergantung pada gonadotropin, FSH diperlukan untuk perkembangan

folikel primer ke tahap preantral. Pada hewan, tingginya kadar FSH akan mempercepat perkembangan folikel primer (Williams dan Gregory, 2012).

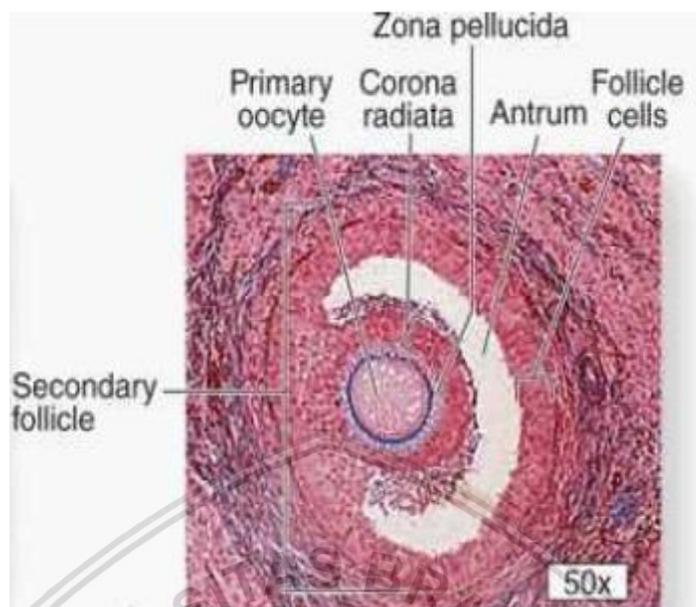


Gambar 2.7 Folikel Primer (Williams dan Gregory, 2012)

Terdiri dari satu atau lebih sel granulosa kuboidal yang tersusun dalam satu lapisan yang mengelilingi oosit (Williams dan Gregory, 2012).

3. Folikel Sekunder

Folikel sekunder adalah folikel preantral dengan 2-10 lapisan sel kuboidal yang membentuk stratifikasi epitel. Transisi dari folikel primer ke sekunder ditandai dengan pembentukan lapisan kedua sel-sel granulosa melalui pembelahan sel. Mekanisme yang mengatur pembelahan mitosis sel granulosa masih belum jelas. Namun penelitian yang dilakukan pada hewan pengerat menunjukkan adanya keterlibatan faktor pertumbuhan *growth differentiation factor-9* (GDF-9). GDF-9 merupakan mitogen untuk sel granulosa (Williams and Gregory, 2012). Ketika stratum granulosum mencapai ketebalan 6-12 lapisan sel, terdapat akumulasi folikuli antara sel-sel granulosa (gambar 2.8). Karena cairan folikel terus menumpuk diantara sel granulosa, mulai terbentuk rongga kecil (antrum). Korona radiata mulai terbentuk samar (Ross, 2011).



Gambar 2.8 Folikel Sekunder (Mescher, 2013)

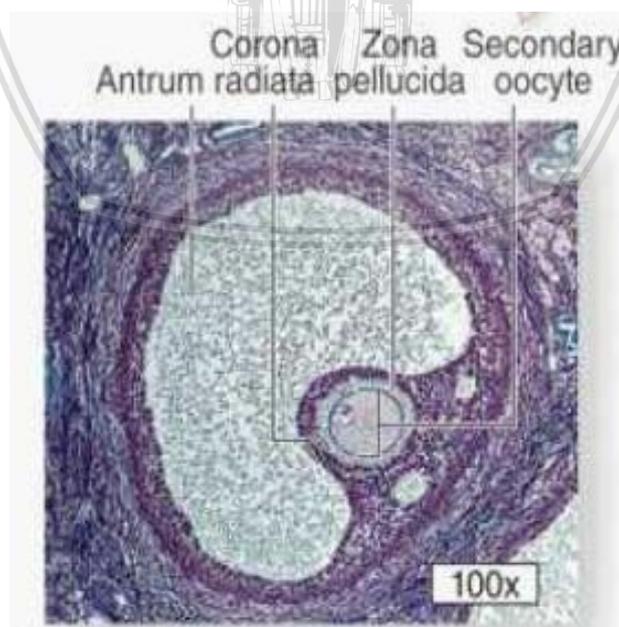
Folikel sekunder mirip dengan folikel primer, tetapi folikel sekunder menunjukkan adanya akumulasi folikuli antara sel-sel granulosa (Mescher, 2013).

Salah satu perubahan penting yang terjadi dalam perkembangan folikel sekunder adalah berkembangnya jaringan teka di sekitar lamina basalis. Jaringan teka terdiri dari lapisan *stroma-like cells*, berdiferensiasi menjadi teka interna dan teka eksterna. Perkembangan jaringan teka disertai dengan pembentukan sejumlah pembuluh darah kecil. Ini adalah peristiwa penting karena darah yang beredar disekitar folikel membawa nutrisi dan hormone (misalnya FSH dan LH), produk limbah dan hasil sekresi folikel sekunder (Williams dan Gregory, 2012).

4. Folikel *de Graaf*

Secara struktural folikel *de Graaf* dapat didefinisikan sebagai folikel dengan ukuran yang relatif besar (diameter 0,4-23 mm), ditandai dengan rongga atau antrum berukuran besar yang mengandung cairan yang disebut cairan folikular atau *liquor folliculi* (gambar 2.9). Ada enam komponen histologis yang

berbeda pada folikel *de Graaf*, diantaranya adalah teka eksterna, teka interna, lamina basalis, sel granulosa, oosit, dan cairan folikular (Williams and Gregory, 2012). Proses pertumbuhan dan perkembangan folikel *de Graaf* dapat dibagi menjadi beberapa tahap berdasarkan ukuran folikel yaitu mulai dari kecil (diameter 1-6 mm), medium (diameter 7-11 mm), besar (diameter 12-17 mm), dan tahap praovulasi (diameter 18-23 mm). Sedangkan folikel atretik pertumbuhannya mencapai ukuran folikel 1-10 mm dan tidak mampu tumbuh kembali ke ukuran yang lebih besar. Ukuran folikel *de Graaf* sebegini besar ditentukan oleh ukuran antrum, terutama ditentukan oleh volume cairan folikuler. FSH selain berperan dalam perkembangan folikel *de Graaf*, juga berperan penting dalam memproduksi cairan folikuler. Peningkatan akumulasi cairan folikuler dan proliferasi sel bertanggung jawab atas pertumbuhan folikel *de Graaf*. Sebaliknya, penghentian aktivitas mitosis dan pembentukan cairan folikuler menentukan ukuran folikel *de Graaf* yang atretik (Williams dan Gregory, 2012).

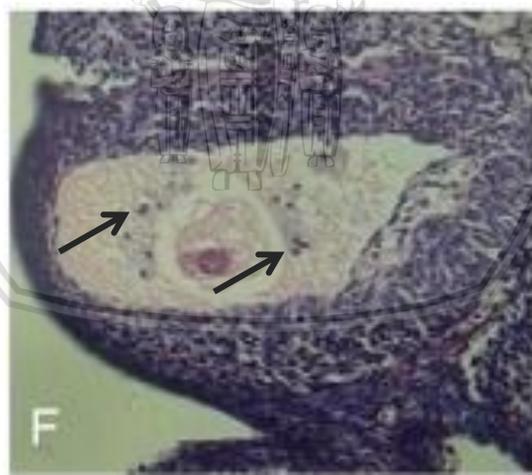


Gambar 2.9 Folikel *de Graaf* (Mescher, 2013)

Folikel *de Graaf* ditandai dengan antrum yang berukuran besar (Mescher, 2013).

5. Folikel Atretik

Melalui proses yang melibatkan mekanisme kematian sel terprogram (*programmed cell-death*) yang disebut apoptosis, 99% folikel ovarium mati melalui atresia. Hasil studi morfometri menunjukkan bahwa atresia adalah kejadian langka pada folikel primordial dan folikel preantral yang sedang berkembang. Namun, atresia folikel ini dikaitkan dengan keberadaan *oocytederived GDF-9* yang berperan dalam menentukan potensi apoptosis folikel. Penarikan FSH (*FSH withdrawal*) merupakan bagian penting dari proses fisiologis. Setelah pertumbuhan dan perkembangan folikel dirangsang oleh FSH, kelangsungan hidup folikel bergantung pada stimulasi FSH yang terus berlanjut. Apabila konsentrasi FSH dibawah ambang batas, apoptosis dipicu melalui mekanisme penarikan FSH, dan folikel mengalami atresia (Williams dan Gregory, 2012).



Gambar 2.10 Folikel Atresia (Williams & Gregory, 2012)

Folikel atresia ditandai terlepasnya sel granulosa dari membran basal dan masuk ke dalam antrum folikuli (Williams dan Gregory, 2012).

Pada gambar 2.10 beberapa sel granulosa terlepas dari susunannya dan masuk ke dalam cairan folikuler. Menurut Janquiera dkk. (1997) folikel

atresia ditandai dengan terlepasnya sel-sel granulosa dari membran basal, terdapat banyak celah diantara sel-sel penyusun membran granulosa serta terlepasnya sel-sel folikel dan masuk ke dalam antrum folikuli (Janquiera dkk., 1997).

2.4 Tikus *Rattus norvegicus*

Tikus merupakan salah satu hewan coba yang digunakan dalam penelitian karena banyak yang menganggap aspek perilaku dan fisiologis tikus lebih relevan dengan manusia dan lebih mudah diamati. Tikus yang sering digunakan dalam penelitian adalah tikus wistar albino (gambar 2.11) (Widiartini dkk., 2013). Terdapat beberapa alasan tikus digunakan sebagai hewan coba yaitu memiliki daya adaptasi yang baik, fungsi dan bentuk organnya serta proses biokimia dan biofisik antara tikus dan manusia memiliki banyak kemiripan, penanganan dan pemeliharaannya mudah, biaya yang dibutuhkan tidak mahal, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia besar, lama kebuntingan singkat, angkakelahiran tinggi, siklus estrus pendek dan karakteristik tiap fase siklus jelas (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).



Gambar 2.11 Tikus *Rattus norvegicus* Galur Wistar (Akbar, 2010).

Kebutuhan pakan seekor tikus putih setiap harinya kurang lebih 10% dari bobot tubuhnya, jika pakan tersebut merupakan bahan kering dan meningkat sampai 15% jika pakan berupa pakan basah. Tikus putih dewasa makan setiap hari antara 12-20 g/kg BB (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Klasifikasi tikus *Rattus novergicus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
 Filum : Chordata
 Subfilum : Vertebrata
 Kelas : Mammalia
 Ordo : Rodensia
 Famili : Muridae
 Subfamili : Murinae
 Genus : Rattus
 Spesies : *Rattus Novergicus*

Sumber: (Akbar, 2010).

2.4.1 Data Biologi Umum Tikus

Tabel 2.2 Data Biologi Umum Tikus

| Parameter | Keterangan |
|---------------|--------------------------------|
| Umur disapih | 21 hari |
| Siklus estrus | 4-5 hari |
| Lama estrus | 9-20 jam |
| Ovulasi | 8-11 jam setelah muncul estrus |
| Perkawinan | Pada waktu estrus |
| Berat lahir | 5-6 gram |
| Berat dewasa | 180-220 gram |

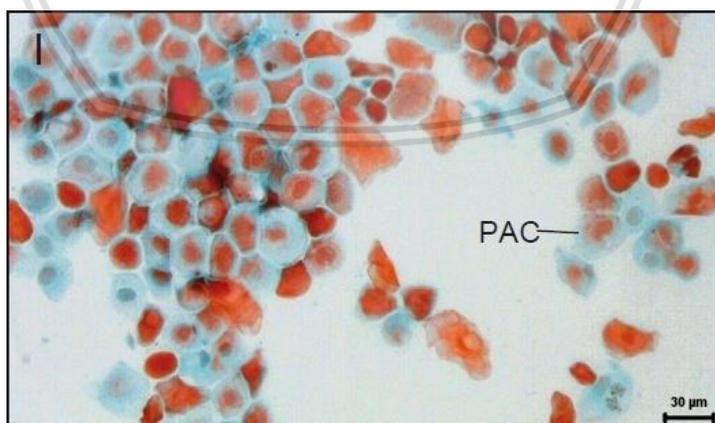
Sumber: (Akbar, 2010).

2.4.2 Siklus Reproduksi Tikus

Siklus estrus adalah siklus reproduksi yang terjadi pada mamalia. Pada tikus, durasi siklus estrusnya pendek, yaitu sekitar 4-5 hari. Pada tikus, siklus estrus dibagi menjadi 4 fase, yaitu (Byers dkk., 2012):

1) Proestrus

Proestrus adalah periode dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel matang dibawah pengaruh FSH, berlangsung 12 jam. Fase proestrus merupakan fase dimana masa pertumbuhan folikel hingga mencapai perkembangan maksimal. Akibatnya sekresi estrogen dalam darah semakin meningkat sehingga akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan saraf, disertai kelakuan berahi pada hewan-hewan betina. Perubahan fisiologis tersebut meliputi pertumbuhan folikel, meningkatnya pertumbuhan endometrium, uteri dan serviks serta peningkatan vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina pada beberapa spesies. Preparat apus vagina (gambar 2.12) pada fase proestrus ditandai akan tampak jumlah sel epitel berinti dan sel darah putih berkurang, digantikan dengan sel epitel bertanduk, dan terdapat lendir yang banyak (Akbar, 2010).

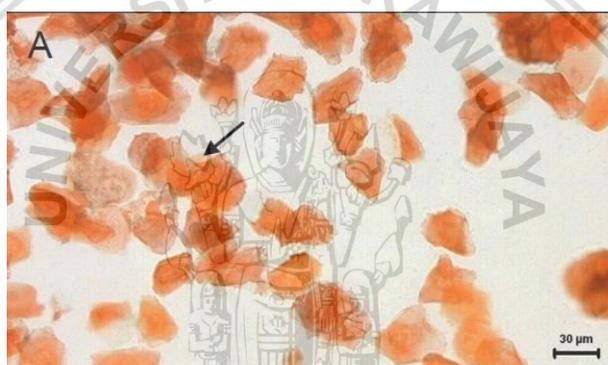


Gambar 2.12 Fase Proestrus Tikus (Paccola dkk., 2013)

Pada fase proestrus, akan didominasi oleh sel epitel berinti. Sel ini akan nampak secara individu ataupun berkelompok. Kadang-kadang sel bertanduk juga terlihat pada penampang lendir vagina tikus. Pada fase ini tampak sel-sel pre-asidofilik (PAC/*pre-acidophilic cells*) (Paccola dkk., 2013).

2) Estrus

Estrus adalah fase yang ditandai oleh penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk berkopulasi, fase ini berlangsung selama 12 jam. Ovum mengalami perubahan-perubahan kearah pematangan. Pada fase ini pengaruh kadar estrogen meningkat sehingga aktivitas hewan menjadi tinggi, telinganya selalu bergerak-gerak dan punggung lordosis. Ovulasi hanya terjadi pada fase ini dan terjadi menjelang akhir siklus estrus. Pada preparat apus vagina (gambar 2.13) ditandai dengan menghilangnya leukosit dan epitel berinti, yang ada hanya epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan berukuran besar (Akbar, 2010).



Gambar 2.13 Fase Estrus Tikus (Paccola dkk., 2013)

Pada fase estrus ditandai dengan terlihatnya sel bertanduk pada penampang lendir vagina tikus dan terlihat bergerombol. Selnnya berbentuk iregular, inti sel tidak terlihat dan sitoplasmanya granular (Paccola dkk., 2013).

3) Metestrus

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus di mana korpus luteum tumbuh cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan *adenohypophysis*. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH oleh *adenohypophysis* sehingga menghambat pembentukan folikel *de Graaf* yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus uterus mengadakan persiapan-persiapan seperlunya untuk menerima

dan memberi makan pada embrio. Menjelang pertengahan sampai akhir metestrus, uterus menjadi agak lunak karena pengendoran otot uterus. Fase ini berlangsung selama 21 jam. Pada preparat apus vagina ciri yang tampak yaitu epitel berinti dan leukosit terlihat lagi dan jumlah epitel menanduk semakin lama semakin sedikit (Akbar, 2010).



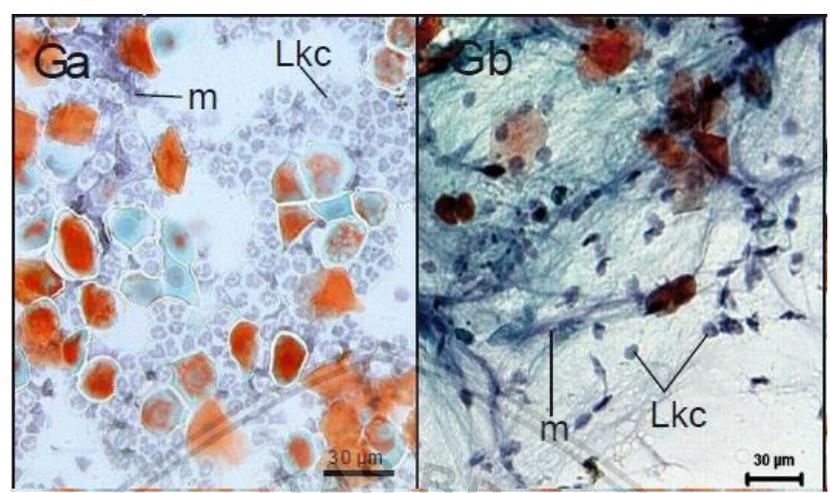
Gambar 2.14 Fase Metestrus (Paccola dkk., 2013)

Pada fase metestrus, mulai terlihat banyak sel-sel leukosit (Lkc = *leukocytes*) (Paccola dkk., 2013).

4) Diestrus

Diestrus adalah periode terakhir dan terlama siklus birahi pada ternak-ternak dan mamalia. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum menjadi matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi nyata. Endometrium lebih menebal dan kelenjar-kelenjar mengalami hipertrofi. Serviks menutup dan lendir vagina mulai kabur dan lengket. Selaput mukosa vagina pucat dan otot uterus mengendor. Pada akhir periode ini korpus luteum memperlihatkan perubahan-perubahan retrogresif dan vakualisasi secara gradual. Endometrium dan kelenjar-kelenjarnya beratrofi atau beregresi ke ukuran semula. Mulai terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke proestrus. Pada preparat apus vagina dijumpai banyak

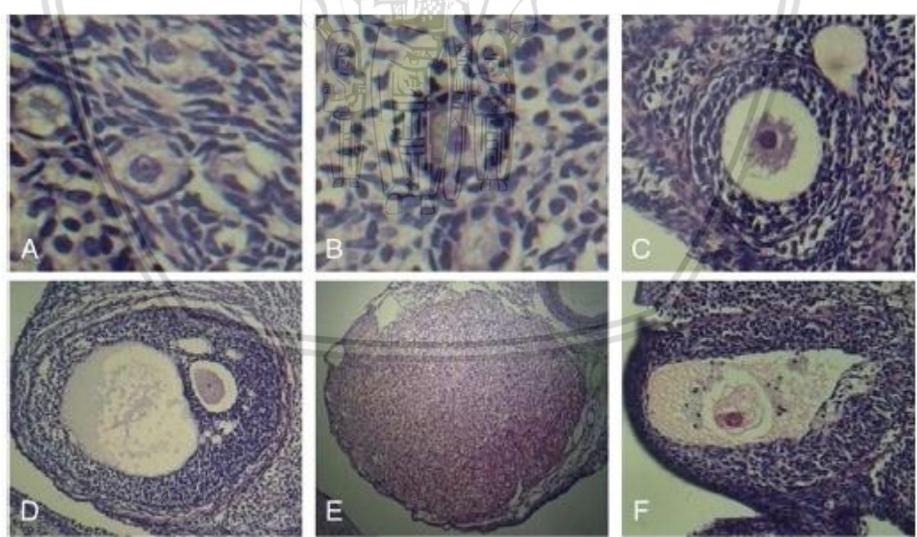
sel darah putih dan epitel berinti yang letaknya tersebar dan homogen (Akbar, 2010).



Gambar 2.15 Fase Diestrus Tikus (Paccola dkk., 2013)

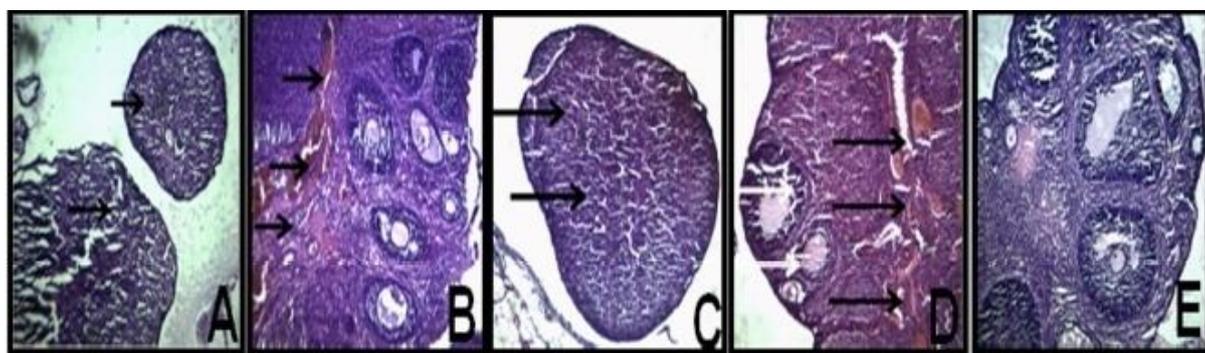
Pada fase diestrus, sel-sel leukositnya tampak terperangkap pada mukus (m = *mucus*; Lkc = *leukocytes*) (Paccola dkk., 2013).

2.4.3 Histologi Folikel Ovarium Tikus



Gambar 2.16 Histologi Folikel Ovarium (Wang dkk., 2014)

Berasal dari tikus yang berusia 7 bulan. (A) folikel primordial; (B) folikel primer; (C) folikel sekunder; (D) folikel antral; (E) korpus luteum; dan (F) folikel atretik (Wang dkk., 2014).



Gambar 2.17 Histologi Ovarium Tikus *Sprague dawley* (BB tikus 100-150 g) setelah Diberikan Paparan MSG (Oladipo dkk., 2015)

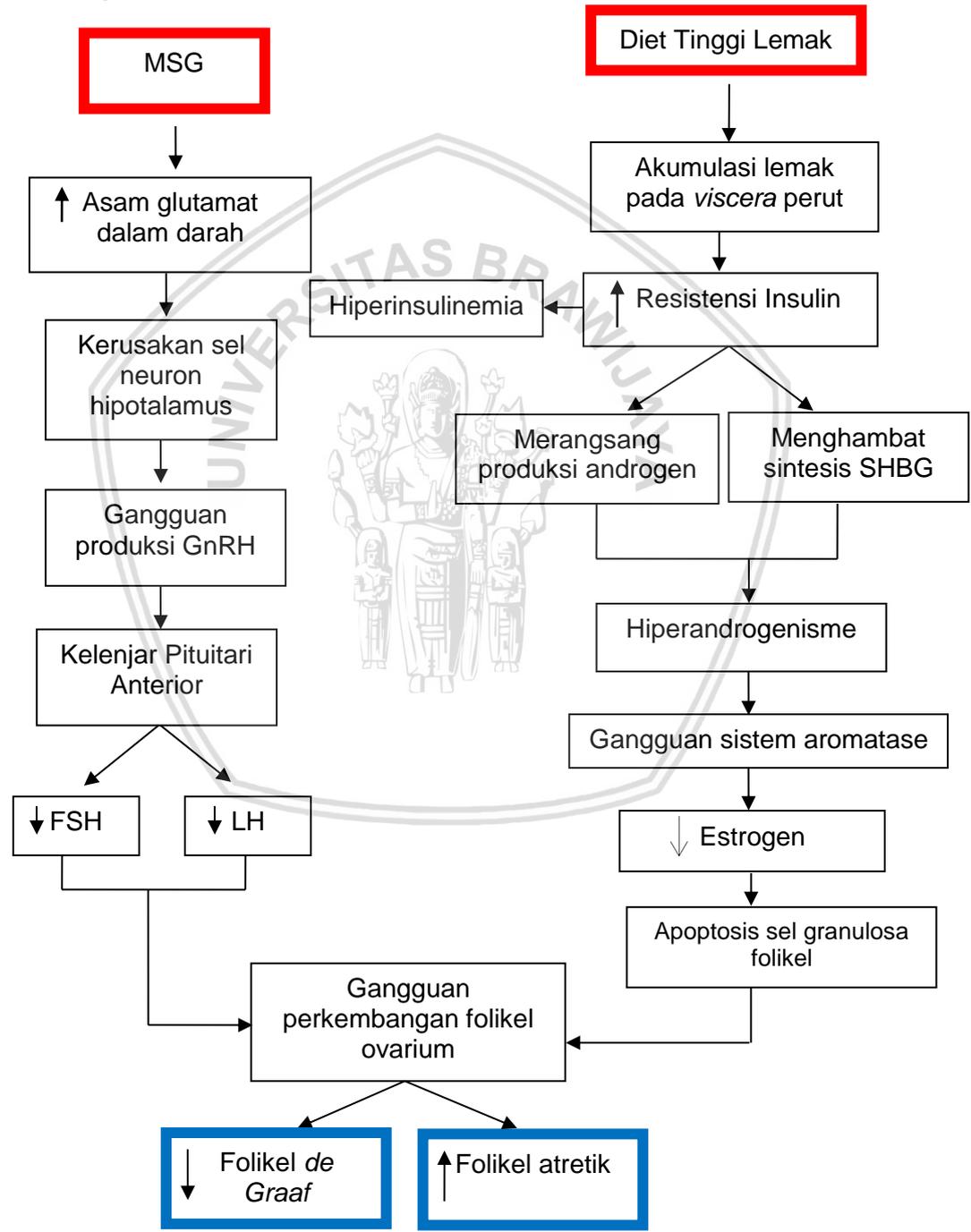
(A) kelompok yang diberikan MSG 0,10 g/kgBB; (B) kelompok yang diberikan MSG 0,15 g/kgBB; (C) kelompok yang diberikan MSG 0,20 g/kgBB; (D) kelompok yang diberikan *food grade* MSG 0,20 g/kgBB; dan (E) kelompok kontrol (Oladipo dkk., 2015).

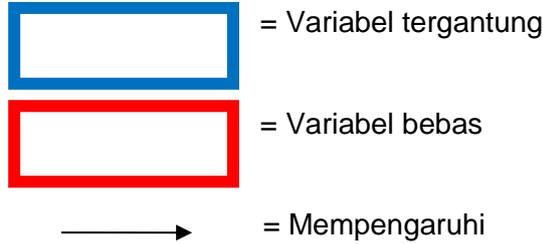
Histopatologi ovarium tikus (gambar 2.17 A) yang diberikan MSG 0,1g/kgBB menunjukkan bahwa ovarium berada pada tahap atretik dan tidak ada folikel yang matur. Kelompok yang diberikan MSG (gambar 2.17 B) 0,15g/kgBB menunjukkan adanya kongesti medula dan terdapat banyak folikel yang berkembang. Selanjutnya, tikus yang diberikan MSG (gambar 2.17 C) 0,20g/kgBB menunjukkan atresia ovarium dan folikular yang berat, sedangkan tikus yang diberikan *food grade* MSG 0,20 g/kgBB MSG (gambar 2.17 D) menunjukkan kongesti medula yang berat dengan sedikit folikel yang matur (Oladipo dkk., 2015).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

MSG merupakan zat aditif yang sering ditambahkan dalam makanan. Penggunaan MSG dengan dosis tinggi dan lama akan memberikan efek samping yang salah satunya dapat mengakibatkan gangguan hormonal. Asam glutamat dirubah menjadi asam ketoglutarat dalam hati. Apabila pemberian glutamat melebihi kemampuan hati dalam memetabolismenya, menyebabkan peningkatan asam glutamat dalam darah. Ion glutamat akan mempengaruhi kerusakan sel neuron hipotalamus dan produksi GnRH dari hipotalamus (Uke, 2008). Gangguan GnRH ini menyebabkan gangguan kelenjar hipofise anterior untuk memproduksi FSH dan LH. FSH adalah hormon yang merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel ovarium (Walker, 2005). Pada awal perkembangan folikel sekunder, zona granulosa berproliferasi dengan cepat dibawah pengaruh hormon FSH. Ketika produksi FSH terganggu, perkembangan folikel primordial menjadi folikel primer juga ikut terhambat, sehingga sebagian besar folikel menjadi atretik (Burkitt, 1995).

Diet tinggi lemak dapat menyebabkan akumulasi lemak yang berlebihan pada *viscera* abdomen (*visceral fat*). Akumulasi lemak pada *viscera* abdomen ini dapat menyebabkan peningkatan resistensi insulin. Pada sindrom resistensi insulin, tingginya insulin akan merangsang produksi androgen dengan berbagai mekanisme (Ogbuji, 2010). Hiperinsulinemia akan menghambat sekresi hepar dalam menghasilkan *Insulin like Growth Factor Binding Protein-I* (IGFBP-I) dan

meningkatkan *Insulin like Growth Factor-I* (IGF-I). Kelebihan insulin akan diikat oleh IGF-I yang bekerja pada sel teka untuk meningkatkan kadar LH. Insulin juga akan mengaktifasi jalur fosforilasi serin yang bisa meningkatkan aktivitas P450c17 pada ovarium dan adrenal yang akan menstimulasi sintesis androgen. (Balen, 2005). Insulin juga menekan kadar *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG) sehingga kadar androgen bebas meningkat. Tingginya kadar androgen akan mengganggu sistem aromatase di dalam sel granulosa. Proses aromatisasi androgen menjadi estradiol akan terganggu, sehingga akan menyebabkan penurunan estrogen dan terjadi penumpukan androgen yang tidak teraromatisasi. Estradiol dikenal berperan penting dalam mencegah stress oksidatif, sehingga rendahnya konsentrasi estrogen menyebabkan peningkatan stress oksidatif folikuler dan ini akan mengawali sel granulosa untuk apoptosis. Hal ini memicu terjadinya atresia folikel lebih dini dan menimbulkan berbagai gambaran klinis Sindrom Ovarium Polikistik (Speroff , 2011).

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG pada tikus *Rattus norvegicus* galur wistar betina dapat menyebabkan penurunan jumlah *de Graaf* dan peningkatan jumlah folikel atretik.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan metode rancangan *Randomized control group post test design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina jenis *Rattus novergicus* galur wistar.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini adalah tikus betina jenis *Rattus novergicus* galur wistar. Tikus yang digunakan berumur 6-8 minggu dengan berat badan 140-200 gram, memiliki bulu rata berwarna putih, sehat, mata jernih, bergerak aktif, dan tingkah laku normal.

4.2.1 Kriteria Inklusi

- 1) Jenis kelamin tikus : betina
- 2) Berat badan tikus : 140-200 gram
- 3) Umur tikus : 6-8 minggu
- 4) Sehat ditandai dengan pergerakan yang aktif, mata berwarna jernih, dan bulu yang tebal berwarna putih.

4.2.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus yang tampak sakit saat dilakukan perlakuan.
- 2) Tikus yang mati selama penelitian berlangsung.
- 3) Tikus yang tidak mencapai fase proestrus pada hari ke-61 perlakuan.

Untuk pengambilan besar sampel dihitung berdasarkan rumus besar sampel (Steel dan Torrie, 1991):

$$n = \left[\frac{(Z_{1/2\alpha} + Z\beta) \sigma}{\delta} \right]^2$$

Diasumsikan $\sigma^2 \approx \delta^2$, sehingga hasilnya:

$$n = (Z_{1/2\alpha} + Z\beta)^2$$

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 6.$$

Keterangan:

n = besar sampel masing-masing kelompok.

$Z_{1/2\alpha}$ = nilai standar normal, yang besarnya tergantung α ,
bila $\alpha = 0,05$, maka $Z_{1/2\alpha} = 1.645$.

$Z\beta$ = nilai tergantung β yang ditentukan (berdasarkan tabel).

Dari hasil perhitungan didapatkan besar sampel = 6 ekor tikus. Karena keterbatasan biaya penelitian, sehingga dalam penelitian ini peneliti menggunakan 5 ekor tikus putih untuk setiap kelompoknya. Total jumlah sampel yang diperlukan adalah $6 \times 5 = 30$ ekor tikus. Tikus akan dikelompokkan secara acak ke dalam 6 kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut:

1. Kelompok Kontrol Negatif (-): tikus wistar yang diberi diet normal 25 g/hari.
2. Kelompok Kontrol Positif (+) 1: tikus yang diberi diet tinggi lemak 25 g/hari.

3. Kelompok Kontrol Positif (+) 2: tikus yang diberi diet normal+MSG 0,7 mg/gBB yang dilarutkan dalam akuades 1 ml.
4. Kelompok P1: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG (dosis msg 0,05 mg/gBB) yang dilarutkan dalam akuades 1 ml.
5. Kelompok P2: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG (dosis msg 0,2 mg/gBB) yang dilarutkan dalam akuades 1 ml.
6. Kelompok P3: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG (dosis msg 0,35 mg/gBB) yang dilarutkan dalam akuades 1 ml.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah folikel *de Graaf* dan atretik tikus betina jenis *Rattus novvergicus* galur wistar.

4.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dengan berbagai dosis. Dosis MSG yang diberikan adalah 0,05; 0,2; dan 0,35 mg/gBB tikus.

4.3.3 Variabel Kendali

Adalah variabel yang berpengaruh terhadap penelitian, namun pengaruh tersebut dapat dikendalikan oleh peneliti. Variabel kendali dalam penelitian ini yaitu jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan tikus, pemberian diet normal, dan kondisi lingkungan kandang.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Faal dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan selama 56 hari sampai 61 hari. Perlakuan pada tikus dilakukan minimal 56 hari didasarkan penelitian Heriansyah (2013) pada tikus jenis *Rattus norvegicus* jantan yang diberikan diet tinggi lemak selama 56 hari secara signifikan menunjukkan peningkatan kadar TG, LDL, dan penurunan kadar HDL tikus. Jangka waktu penelitian dari 56 sampai 61 hari ditentukan berdasarkan rata-rata siklus estrus normal pada tikus yaitu 4-5 hari (Byers dkk., 2012).

4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan

4.5.1.1 Bahan Makanan Tikus

- a. Pakan normal yang diberikan pada saat aklimatisasi adalah *Comfeed PARS* sebanyak 20 gr.
- b. Pakan normal yang diberikan pada saat perlakuan memiliki komposisi tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir, dan air 750 ml (Reeves, 1997; Handayani, 2012).
- c. MSG *L-glutamic acid monosodium salt hydrate* 99%. Dosis MSG yang digunakan adalah 0,7; 0,05; dan 0,2; dan 0,35 mg/gBB tikus masing-masing dilarutkan dalam 1 ml akuades.
- d. Diet Tinggi Lemak memiliki komposisi (untuk 2,5 kg pakan): tepung jagung 550 gram, gula pasir 457,5 gram, korsevet 275 gram, margarin 275 gram, *soybean oil* 130 gram, gelatin 130 gram, kasein 335 gram, CMC 132,5 gram,

vitamin dan mineral 25 butir, air 375 gram, pewarna hijau 20 tetes, dan asam kolat 5 gram (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

- e. Minuman hewan coba adalah air matang.

4.5.1.2 Bahan Untuk Pembedahan Hewan Coba

- a. Ketamin 0,2 ml untuk menganastesi hewan coba.

4.5.1.3 Bahan Pengamatan Histologi

Xylol, *alcohol absolute*, alkohol 90%, alkohol 80%, air, *hematoxylin*, HCL 0,6%, lithium karbonat 0,5%, entelan dan eosin.

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Kandang tikus yang berupa *box* plastik berukuran 15 x 30 x 42 cm sebanyak 30 buah diisi dengan sekam dan ditutup dengan kawat kasa. Masing-masing kandang ditempati 1 ekor tikus.
- b. Tempat minum

4.5.2.2 Alat pembuat dan pemberian bahan makanan binatang coba

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur, wadah minum, pengaduk, dan nampan.

4.5.2.3 Alat Untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

- a. Neraca Ohaus Sartorius.

4.5.2.4 Alat Pemeriksaan Histologi

Cover glass, object glass, pinset, dan mikroskop Olympus Xc 10.

4.5.2.5 Alat Bedah hewan coba

Toples, gunting bedah, sterofoam, pinset, pisau bedah, dan kapas.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

Tabel 4.1 Definisi Istilah/Operasional Penelitian

| Variabel | Definisi | Skala | Satuan |
|-------------------|--|-------|---------------------|
| Hewan Coba | Hewan coba yang digunakan adalah 30 tikus betina jenis <i>Rattus norvegicus</i> galur wistar. Hewan coba dibeli dari Lab. Institut Biosains Universitas Brawijaya Malang. | Rasio | Ekor |
| Diet tinggi lemak | Diet tinggi lemak yang diberikan memiliki komposisi tepung jagung 550 gram, gula pasir 457,5 gram, korsvet 275 gram, margarin 275 gram, <i>soybean oil</i> 130 gram, gelatin 130 gram, kasein 335 gram, CMC 132,5 gram, vitamin dan mineral 25 butir, air 375 gram, pewarna hijau 20 tetes, dan asam kolat 5 gram (Reeves, 1997; Handayani, 2012). Diet tinggi lemak yang diberikan 25 g/hari selama 8 minggu. | Rasio | g/hari |
| MSG | MSG yang digunakan adalah <i>L-glutamic acid monosodium salt hydrate</i> 99%. Dosis MSG yang diberikan adalah 0,7; 0,05; 0,2; dan 0,35 mg/gBB tikus, masing-masing dilarutkan dalam akuades 1mL. | Rasio | mg/g BB tikus |
| Diet normal | Diet normal yang diberikan memiliki komposisi tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, <i>soybean oil</i> 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir, air 750 ml, dan pewarna pink 30 tetes (Reeves, 1997; Handayani, 2012). Diet normal yang diberikan 25 g/hari selama 8 minggu. | Rasio | g/hari |
| Folikel ovarium | Folikel ovarium diamati dan dihitung jumlahnya dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. a. Folikel <i>de Graaf</i> Memiliki ukuran yang relatif besar (diameter 0,4-23 mm), terdapat rongga atau antrum besar yang mengandung cairan yang disebut cairan folikular | Rasio | Sel |

atau *liquor folliculi*, teka eksterna, teka interna, lamina basalis, sel granulosa, dan oosit (Williams dan Gregory, 2012).

b. Folikel atretik

Terlepasnya sel-sel granulosa dari membran basal, terdapat banyak celah diantara sel-sel penyusun membran granulosa serta terlepasnya sel-sel folikel dan masuk ke dalam antrum folikuli (Janquiera dkk., 1997).

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi merupakan prosedur untuk mengadaptasikan hewan coba dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stress. Tikus dibiarkan selama 1 minggu di dalam kandang untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan diberikan pakan pakan standar (normal) sebanyak 30 g/hari. Pemberian pakan tikus dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba tikus betina sesuai dengan kriteria inklusi sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dengan metode rancangan acak lengkap dilakukan agar setiap hewan coba berpeluang sama untuk mendapat kesempatan sebagai sampel baik dalam kelompok penelitian maupun dalam kelompok kontrol.

4.7.2 Proses Pemeliharaan Hewan Coba

- a. Sebelum perlakuan, berat badan tikus ditimbang, yaitu pada awal masa adaptasi untuk mengambil rata rata berat badan tikus sehingga pemberian dosis dapat disamakan pada semua tikus dan akhir masa adaptasi sehingga dapat dipantau berat badan tikus.

- b. Pada saat perlakuan, pemberian pakan pada kelompok kontrol negatif memiliki komposisi tepung jagung 615 gram, gula pasir 85 gram, *soybean oil* 45 gram, gelatin 65 gram, kasein 90 gram, CMC 51 gram, vitamin dan mineral 5 butir, dan air 750 ml (Reeves, 1997; Handayani, 2012).
- c. Pemberian diet tinggi lemak diberikan sebagai pakan tikus.
- d. Pemberian MSG dilakukan melalui sonde lambung sesuai dengan takaran pada tiap kelompok. Hal ini dilakukan untuk menjaga dosis pemberian MSG pada tikus.
- e. Dilakukan penimbangan bahan makanan pada tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari untuk mengetahui asupan makanan tikus.
- f. Perlakuan tikus dilakukan secara bersamaan selama minimal 56 hari dan sekam diganti setiap pagi (3 hari/kali).
- g. Pada akhir penelitian setelah 56 hari, tikus yang berada pada fase proestrus dilakukan pembedahan, sedangkan tikus yang belum mencapai fase proestrus dilanjutkan perlakuannya sampai mencapai fase proestrus maksimal hari ke-61. Jika pada hari ke-61 tikus belum mencapai fase proestrus, maka tikus masuk dalam kriteria eksklusi.

4.7.3 Pembuatan Diet Normal

Pembuatan diet normal dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 4.2 Komposisi untuk 1 kg Pakan Normal Tikus

| Komposisi | Jumlah |
|---------------------|----------|
| Tepung jagung | 615 gram |
| Gula pasir | 85 gram |
| Soybean oil | 45 gram |
| Gelatin | 65 gram |
| Kasein | 90 gram |
| CMC | 51 gram |
| Vitamin dan mineral | 5 butir |

Air 750 ml
 Sumber: (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

Bahan yang disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah kemudian dicampur. Pakan dibentuk bulatan-bulatan kemudian ditimbang sesuai dengan konsumsi pakan tikus basah yaitu 15% dari BB tikus. Jika pakan normal berupa pakan kering, kebutuhan pakan untuk tikus adalah 10% dari berat badannya, sehingga kebutuhan pakan tikus adalah 20 gram/hari. Dalam penelitian ini rata-rata berat badan tikus adalah 160,6 gr sehingga kebutuhan pakan = $15\% \times 160,6 = 24,09$ gram (dibulatkan menjadi 25 gram).

4.7.4 Pembuatan Diet Tinggi Lemak

Pembuatan diet tinggi lemak dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 4.3 Komposisi untuk 2,5 kg Diet Tinggi Lemak Tikus

| Komposisi | Jumlah |
|---------------------|------------|
| Tepung jagung | 550 gram |
| Gula pasir | 457,5 gram |
| Korvet | 275 gram |
| Margarin | 275 gram |
| Soybean oil | 130 gram |
| Gelatin | 130 gram |
| Kasein | 335 gram |
| CMC | 132,5 gram |
| Vitamin dan mineral | 25 butir |
| Air | 375 gram |
| Pewarna hijau | 20 tetes |
| Asam kolat | 5 gram |

Sumber: (Reeves, 1997; Handayani, 2012).

Bahan yang disiapkan dan ditimbang sesuai dengan komposisi dan jumlah kemudian dicampur, air dan gula dipanaskan hingga mendidih dicampur gelatin lalu dicampurkan dengan bahan lain yang sudah dicampur dan setelah itu diaduk rata. Pakan dibentuk bulatan-bulatan kemudian ditimbang sesuai dengan konsumsi pakan tikus basah yaitu 15% dari BB tikus. Dalam penelitian ini rata-

rata berat badan tikus adalah 160,6 gr sehingga kebutuhan pakan = $15\% \times 160,6$
= 24,09 gram (dibulatkan menjadi 25 gram).

4.7.5 Pemberian MSG

Pemberian MSG diberikan pada kelompok kontrol (+) 2, dan kelompok perlakuan (P1, P2, dan P3). Dosis MSG yang diberikan mengacu pada penelitian Megawati dkk. (2005) dimana kelompok perlakuan diberikan MSG dengan dosis 77 mg, 98 mg, 119 mg, dan 140mg/200gBB tikus. Pemberian dosis MSG 140mg/200gBB tikus menunjukkan bahwa jumlah folikel sekunder dan korpus luteum menurun serta folikel atresia jumlahnya meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Oleh karena itu, pada penelitian ini menggunakan dosis MSG yaitu 0,7 mg/gBB tikus pada kelompok kontrol (+) 2. Peneliti melakukan penurunan dosis pada kelompok percobaan mendekati dosis yang dikonsumsi oleh manusia. Konsumsi MSG pada manusia berdasarkan penelitian Andarwulan dkk., (2011), di Bogor (847,04 mg/kepala/hari) lebih tinggi dibandingkan dengan Jakarta (615,87mg/kepala/hari). Maka rata-rata konsumsi MSG dapat diperkirakan $(847,04 + 615,87) / 2 = 731,455$ mg/ kepala/hari. Jika dikonversikan ke dosis tikus (200 g) maka $731,455 \times 0,018$ (Tabel. 4.4) = 13,17 mg/ 200gr BB = 0,06 mg/gram BB. Peneliti menggunakan dosis pertama 0,05 mg/gBB dan pemberian dosis kedua dan ketiga menggunakan interval 1,5 yaitu 0,2 mg/gBB dan 0,35 mg/gBB. MSG dicampurkan ke dalam aquades 1 ml dengan dosis yang sesuai dengan kelompok perlakuan. MSG diberikan secara oral dengan menggunakan sonde.

Tabel 4.4 Konversi Perhitungan Dosis dari Manusia Terhadap Tikus

| | Mencit (20 g) | Tikus (200 g) | Marmot (400 g) | Kelinci (1,5 kg) | Kera (4 kg) | Anjing (12 kg) | Manusia (70 kg) |
|---------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|----------------|-------------------|--------------------|
| Mencit (20 g) | 1,0 | 7,0 | 12,25 | 27,8 | 64,1 | 124,2 | 387,9 |
| Tikus (200 g) | 0,14 | 1,0 | 1,74 | 3,9 | 9,2 | 17,8 | 56,0 |
| Marmot (400 g) | 0,08 | 0,57 | 1,0 | 2,25 | 5,2 | 10,2 | 31,5 |
| Kelinci (1,5 kg) | 0,04 | 0,25 | 0,44 | 1,0 | 2,4 | 4,5 | 14,2 |
| Kera (4 kg) | 0,016 | 0,11 | 0,19 | 0,42 | 1,0 | 1,9 | 6,1 |
| Anjing (12 kg) | 0,008 | 0,06 | 0,10 | 0,22 | 0,52 | 1,0 | 3,1 |
| Manusia (70 kg) | 0,0026 | 0,018 | 0,031 | 0,07 | 0,16 | 0,32 | 1,0 |

Sumber: (Donatus, 1996).

4.7.6 Penentuan Fase Estrus

Penentuan fase estrus ini menggunakan pemeriksaan swab vagina pada hari ke-56 paparan. Langkah-langkah pengambilan swab vagina adalah: mempersiapkan *cotton buds*, *cover glass*, kaca objek, cat *giemsa*, dan mikroskop. Masukkan *cotton buds* ke lubang vagina untuk mendapatkan lendir, lalu letakkan lendir ke *objek glass* dan diberi cat *Metilen Blue*. Setelah pemberian *Metilen Blue*, ditutup dengan *cover glass*. Slide swab vagina diperiksa menggunakan mikroskop untuk menentukan fase proestrus. Pada penelitian ini pembedahan dilakukan pada fase proestrus karena fase ini merupakan fase folikuler pada tikus wistar betina, dimana pada fase ini ovarium dalam keadaan proliferasi dan terjadi peningkatan estrogen. Apabila pada hari ke-56 ada tikus yang belum mencapai fase proestrus, maka penelitian tetap dilanjutkan kurang lebih 4-5 hari sampai mencapai fase proestrus.

4.7.7 Prosedur Pengerjaan Preparat Histo Patologi

1. Proses Pemotongan Jaringan

Sebelum dibedah, tikus dianastesi terlebih dahulu dengan menggunakan ketamin. Tikus dibiarkan lemas, kemudian dibedah dan diambil organ ovariumnya, dibersihkan dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS). Jaringan atau spesimen harus sudah terfiksasi dengan formalin 10% atau dengan bafer formalin 10% minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya. Jaringan (ovarium) dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan diteliti. Jaringan dipotong ± ketebalan 2-3 milimeter, lalu dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti. Jaringan kemudian diproses dengan alat *Automatic Tissue Tex Prosesor* atau dengan cara manual selama 90 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

2. Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan

Jaringan diangkat dari mesin *Tissue Tex Prosesor*, kemudian diblok dengan paraffin sesuai kode jaringan. Bagian ovarium dipotong dengan alat *microtome* dengan ketebalan 3-5 mikron (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017). Bagian ovarium yang dipotong adalah bagian tengah, bagian pinggir kanan dan kiri sepanjang sumbu panjang ovarium.

3. Proses Deparafinisasi

Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, jaringan di letakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80 derajat, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan sylol masing-masing 20 menit. Setelah itu di masukan ke dalam 4 tabung alkohol, masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

4. Proses Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE)

Pada proses pewarnaan dengan HE, potongan jaringan dimasukkan ke dalam cat utama Harris Hematoksin selama 10-15 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit, alkohol asam 1% sebanyak 2-5 celupan, ammonia lithium karbonat sebanyak 3-5 celupan, dan ke dalam eosin selama 10-15 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

5. Proses Dehidrasi dengan Alkohol Bertingkat

Pada tahap dehidrasi, jaringan dimasukkan ke dalam alkohol 70% selama 3 menit, alkohol 80% selama 3 menit, alkohol 96% selama 3 menit, dan ke dalam alkohol absolut selama 3 menit (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

6. Proses Penjernihan (*Clearing*)

Jaringan dimasukkan ke dalam larutan *xylol* selama 15 menit sebanyak 2 kali (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

7. Mounting dengan Entelan dan *Deckglass*

Slide atau kaca objek ditutup dengan *cover glass* dan dibiarkan kering pada suhu ruangan. Setelah kering slide siap untuk diamati dengan mikroskop (Laboratorium Patologi Anatomi FKUB, 2017).

4.7.8 Pengamatan Histologi Ovarium Tikus dan Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium

Preparat ovarium diamati dari 3 irisan dengan potongan sagital. Tiap preparat diamati pada seluruh lapang pandang menggunakan mikroskop *Olympus Xc 10* dengan pembesaran 400 X, dihitung jumlah folikel *de Graaf* dan folikel atretik.

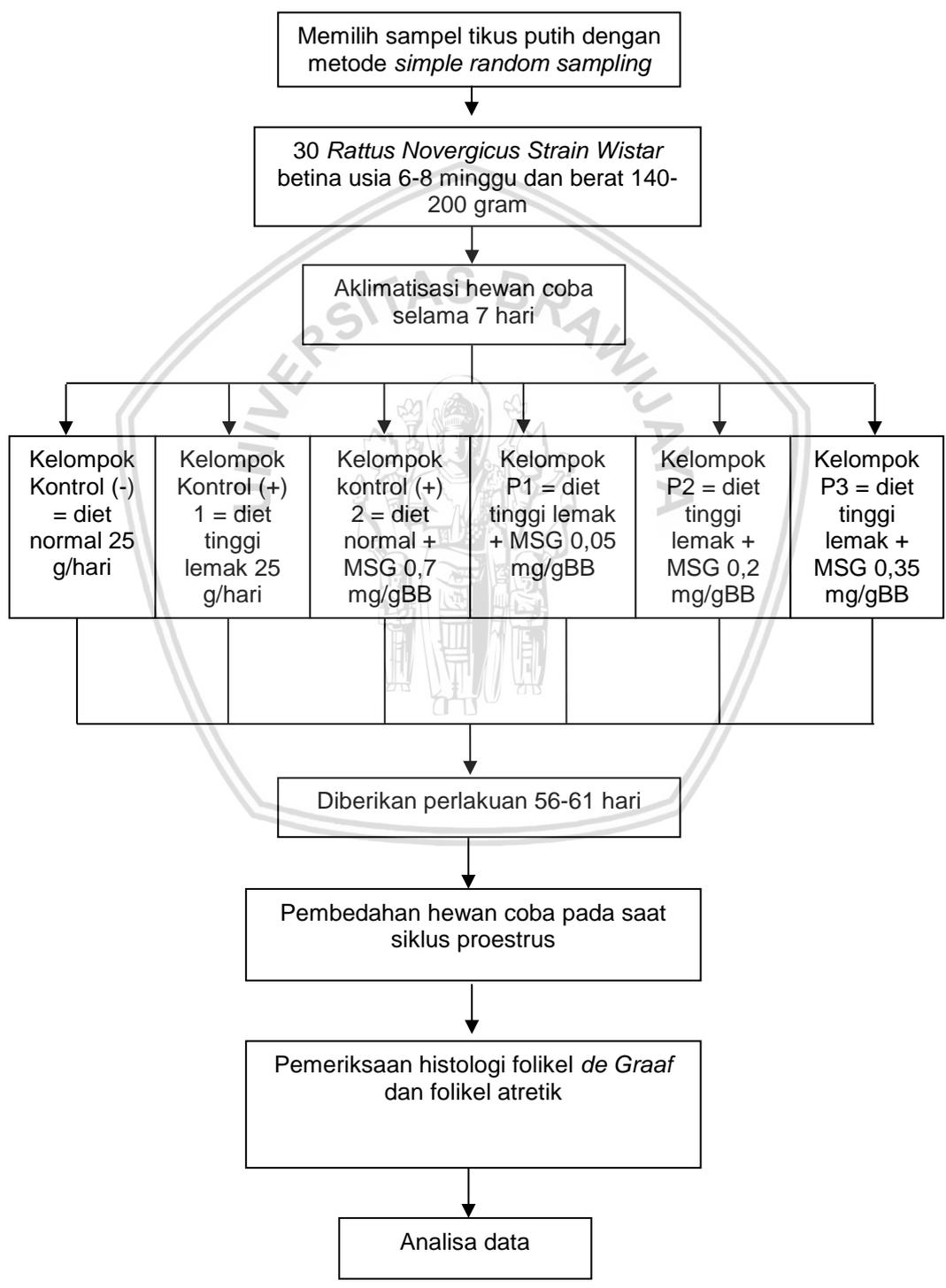
4.8 Analisis Data

Pengambilan data dan analisa dilakukan setelah 56 hari penelitian. Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 19.0 for Windows* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p < 0,05$). Jika nilai p (p values) $> 0,05$ dikatakan tidak signifikan, dan jika p values $< 0,01$ dikatakan sangat signifikan. Langkah-langkah uji data adalah sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data: bertujuan untuk mengetahui apakah data memiliki sebaran/distribusi yang normal atau tidak. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini adalah uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50 ($n \leq 50$). Data dikatakan memiliki persebaran normal jika $p > 0,05$.
- b. Uji homogenitas varian menggunakan uji Levene. Data dikatakan memiliki varian yang homogen apabila nilai signifikansinya $p > 0,05$.
- c. Uji *One Way ANOVA* (analisa varian satu arah): bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Perbedaan pada kedua kelompok dianggap signifikan bila $p < 0,05$.
- d. *Post hoc test*: untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji ANOVA. Uji Pos Hoc yang digunakan adalah uji Tukey HSD dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$ (Hanafiah, 2012).
- e. Apabila didapatkan distribusi data tidak normal maka dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.

Kemudian dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang memiliki perbedaan bermakna.

4.9 Skema Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Faal dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dari bulan Agustus sampai dengan bulan November 2017. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan metode rancangan *Randomized control group post test design*. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina jenis *Rattus novergicus* galur wistar sebanyak 30 ekor yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

Penelitian ini menguji tentang pengaruh pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan atretik pada ovarium tikus *Rattus novergicus* galur wistar betina. Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dilakukan selama 56-61 hari (1 minggu aklimatisasi untuk mengadaptasikan tikus terhadap lingkungan yang baru). Hewan coba pada penelitian ini dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yang berbeda-beda yaitu: 1) kelompok kontrol (-) tikus wistar yang diberi diet normal 25 g/hari; 2) kelompok kontrol positif (+) 1 tikus yang diberi diet tinggi lemak 25 g/hari; 3) kelompok kontrol positif (+) 2 tikus yang diberi diet normal+MSG 0,7 mg/gBB yang dilarutkan dalam akuades 1 ml; 4) kelompok P1 tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,05 mg/gBB yang dilarutkan dalam akuades 1 ml; 5) kelompok P2: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,2 mg/gBB yang dilarutkan dalam akuades 1 ml; dan 6) kelompok P3: tikus yang diberi diet tinggi lemak+MSG 0,35 mg/gBB yang dilarutkan dalam akuades 1 ml. Selama 56-61 hari tikus dilakukan

swab vagina. Pada hari ke 57 dilakukan swab vagina tikus, jika hasilnya menunjukkan fase proestrus maka dilanjutkan dengan pembedahan tikus. Apabila tikus belum mencapai proestrus maka perlakuan dilanjutkan sampai hari ke-61, dan apabila sudah mencapai fase proestrus (gambar 5.1) maka tikus langsung dibedah.

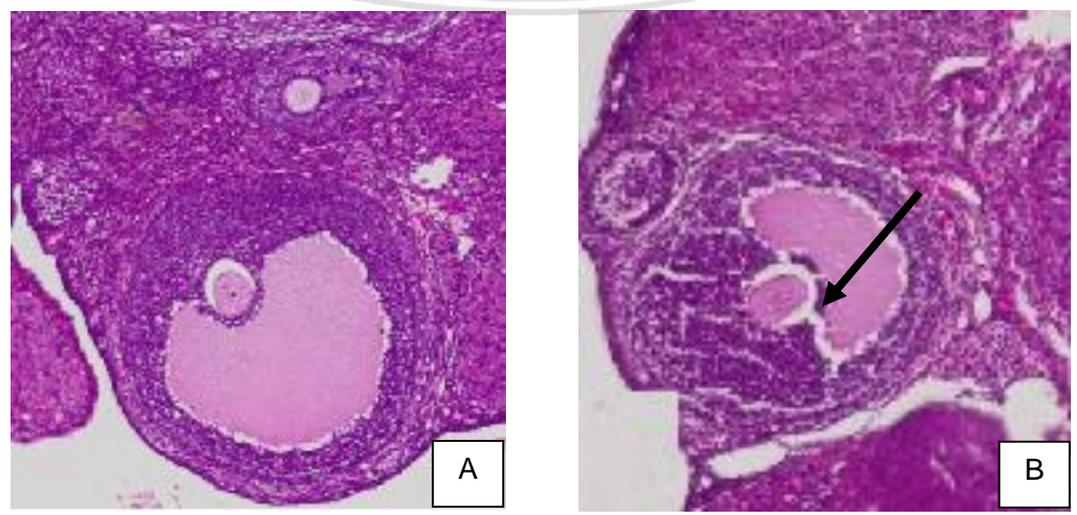


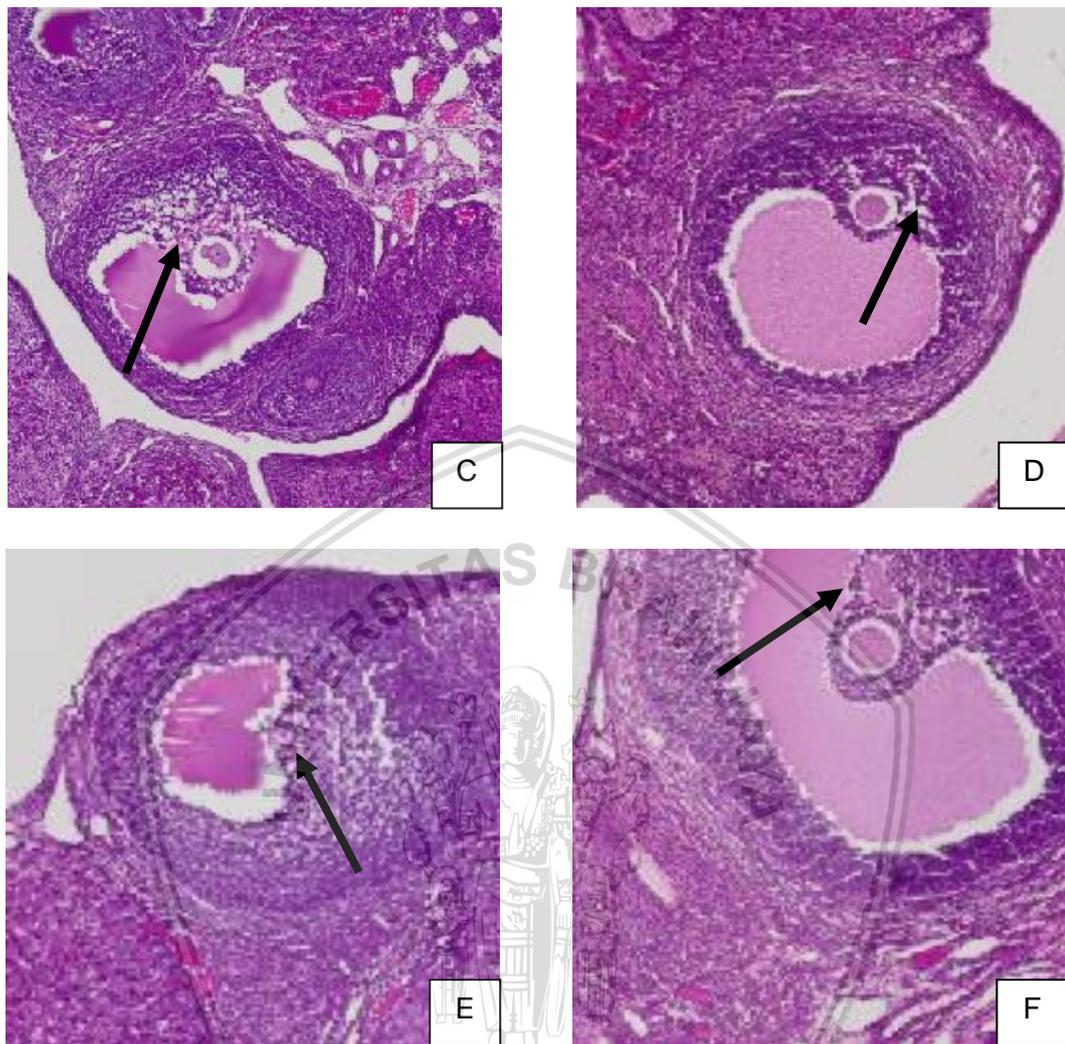
Gambar 5.1 Fase Proestrus Tikus.

Tanda panah menunjukkan sel epitel berinti yang dominan terdapat pada fase proestrus.

1.1 Sediaan Ovarium Untuk Mengamati Folikel *de Graaf* dan Atretik

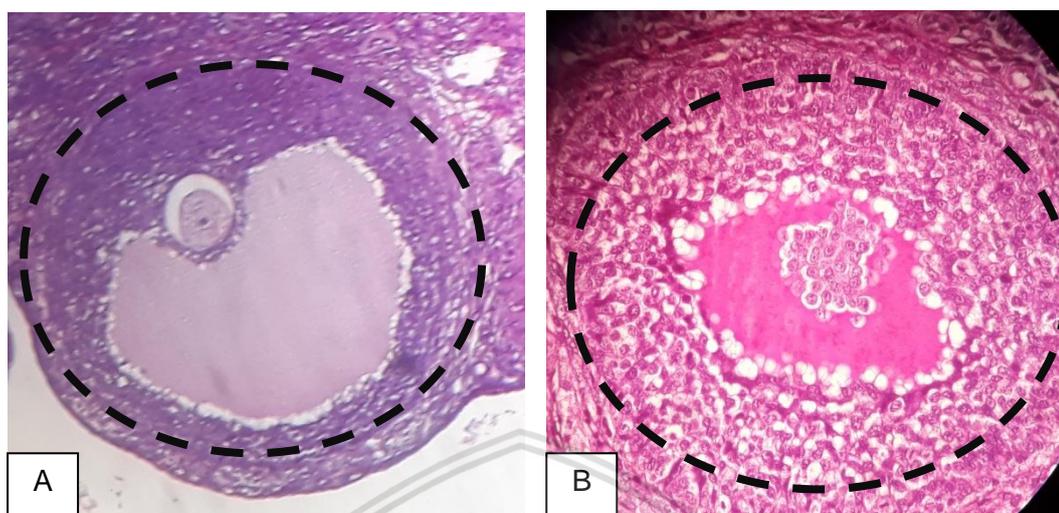
Penghitungan jumlah folikel ovarium dilakukan pada sediaan histopatologis menggunakan mikroskop. Folikel yang dihitung adalah folikel *de graaf* dan folikel atretik yang dapat dilihat pada gambar 5.2 dan 5.3.





Gambar 5.2 Folikel *de Graaf* pada masing-masing kelompok. (Dilihat dengan mikroskop *Olympus Xc 10* pada pembesaran 400X)

Tanda panah menunjukkan kerusakan folikel *de Graaf* yang ditunjukkan dengan celah diantara sel-sel granulosa/tidak teraturnya susunan sel granulosa. (A) Kelompok tikus yang tidak mendapat perlakuan, (B) Kelompok tikus yang diberikan diet tinggi lemak (DTL) 25 gr/hari, (C) Kelompok tikus yang diberikan MSG 0,7 mg/gBB, (D) Kelompok tikus yang diberikan DTL+MSG 0,05 mg/gBB, (E) Kelompok tikus yang diberikan DTL+MSG 0,2 mg/gBB, dan (F) Kelompok tikus yang diberikan DTL+MSG 0,35 mg/gBB.



Gambar 5.3 Folikel de Graaf (A) Tikus yang Tidak Diberi Perlakuan dan Folikel Atretik (B) Tikus dengan MSG 0,7 mg/gBB (Pembesaran 400x).

Lingkaran dengan garis putus-putus menunjukkan folikel *de Graaf* dan atretik. Folikel *de Graaf* (A) ditandai dengan rongga atau antrum berukuran besar yang mengandung cairan yang disebut cairan folikular, dan folikel atretik (B) ditandai dengan terlepasnya sel-sel granulosa dari membran basal, terdapat banyak celah diantara sel-sel penyusun membran granulosa serta terlepasnya sel-sel folikel dan masuk ke dalam cairan folikular.

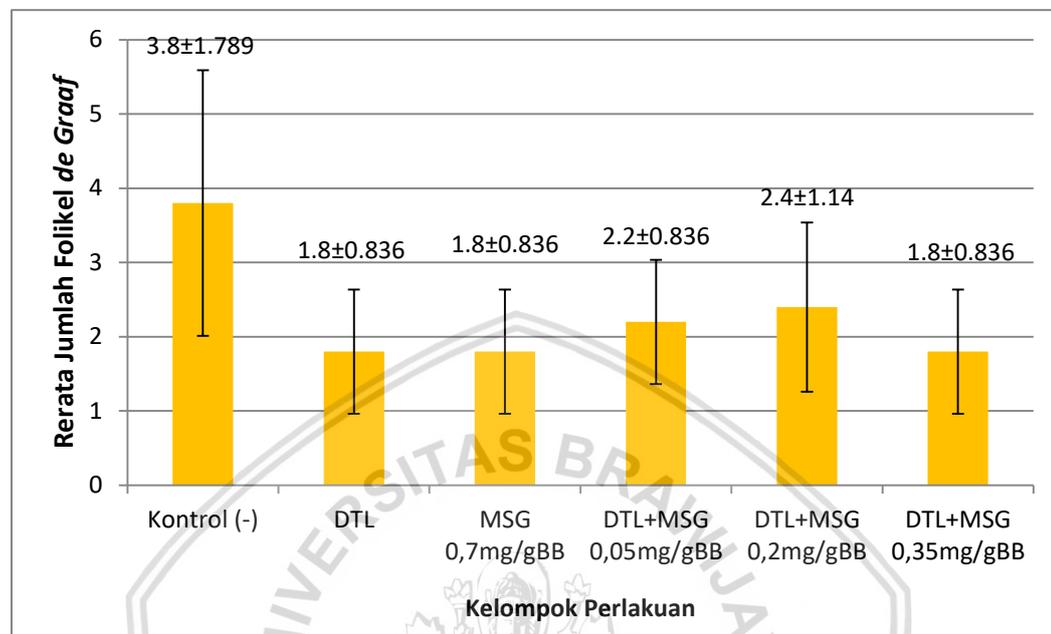
1.2 Data Hasil Penelitian

1.2.1 Analisis Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji *Levene*. Berdasarkan hasil pengujian normalitas data folikel *de Graaf* dan atretik didapatkan $p\text{-value} > 0,05$ sedangkan hasil uji homogenitas data didapatkan $p\text{-value} > 0,05$ sehingga, dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa asumsi normalitas dan homogenitas data telah terpenuhi.

1.2.2 Rerata Jumlah Folikel *de Graaf* dan Atretik Pada Ovarium Tikus

1.2.2.1 Folikel *de Graaf*



Gambar 5.4 Rerata Jumlah Folikel *de Graaf* Pada Tiap Kelompok.

Berdasarkan gambar 5.4 di atas, tikus pada kelompok kontrol positif 1, kontrol positif 2, dan perlakuan 3 memiliki rerata jumlah folikel *de Graaf* paling rendah. Pada kelompok kontrol negatif memiliki rerata jumlah folikel *de Graaf* paling tinggi dibandingkan kelompok yang lain, hal ini menunjukkan bahwa terdapat penurunan rerata jumlah folikel *de Graaf* pada kelompok tikus yang diberikan perlakuan diet tinggi lemak, MSG, maupun kombinasi diet tinggi lemak dan MSG. Untuk melihat perbedaan jumlah folikel *de Graaf* signifikan atau tidak, dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA.

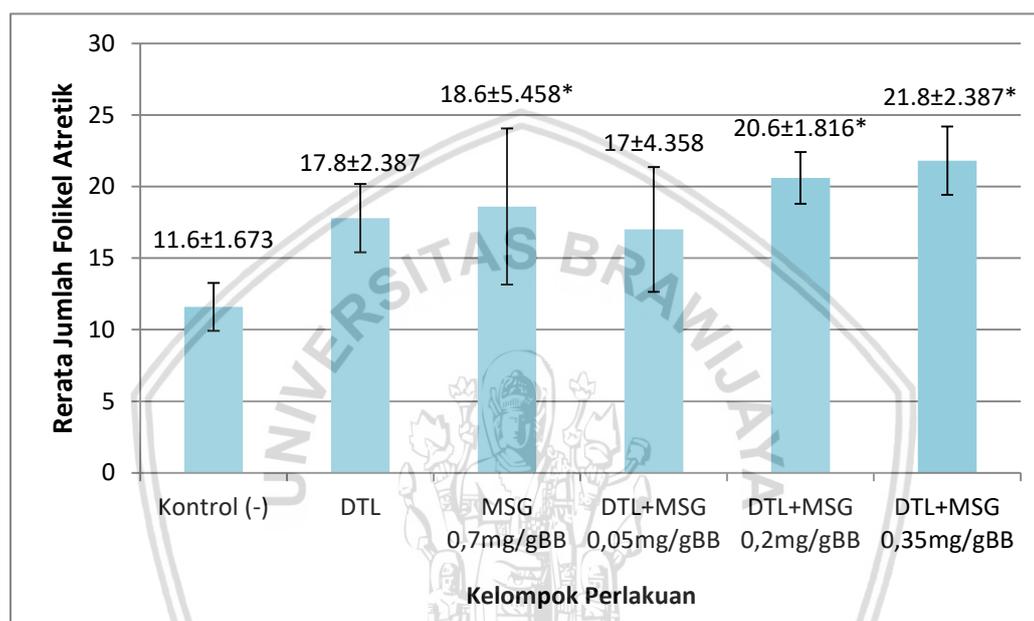
Tabel 5.1 Hasil Pengujian ANOVA Jumlah Folikel *de Graaf*

| Perlakuan | Mean±SD | p-value |
|---------------|-------------|---------|
| Kontrol (-) | 3.8 ± 1.789 | 0,06 |
| Kontrol (+) 1 | 1.8 ± 0.836 | |
| Kontrol (+) 2 | 1.8 ± 0.836 | |
| Perlakuan 1 | 2.2 ± 0.836 | |
| Perlakuan 2 | 2.4 ± 1.140 | |
| Perlakuan 3 | 1.8 ± 0.836 | |



Berdasarkan tabel 5.1 di atas, didapatkan *p-value* sebesar 0,06, nilai *p-value* >0,05 sehingga dari pengujian ini tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah folikel *de Graaf* dalam kelompok.

1.2.2.2 Folikel Atretik



Gambar 5.5 Rerata Jumlah Folikel Atretik Pada Tiap Kelompok.

p-value<0,05 adalah bermakna (*) jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

Berdasarkan gambar 5.5 di atas, tikus pada kelompok kontrol negatif memiliki rerata jumlah folikel atretik paling rendah. Pada kelompok perlakuan 3 memiliki rerata jumlah folikel atretik paling tinggi dibandingkan kelompok yang lain, hal ini menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata jumlah folikel atretik pada kelompok tikus yang diberikan perlakuan kombinasi diet tinggi lemak dan MSG. Untuk melihat perbedaan jumlah folikel atretik signifikan atau tidak, dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA.

Tabel 5.2 Hasil Pengujian ANOVA Jumlah Folikel Atretik

| Perlakuan | Mean±SD | p-value |
|---------------|--------------|---------|
| Kontrol (-) | 11.6 ± 1.673 | 0,001 |
| Kontrol (+) 1 | 17.8 ± 2.387 | |
| Kontrol (+) 2 | 18.6 ± 5.458 | |
| Perlakuan 1 | 17 ± 4.358 | |
| Perlakuan 2 | 20.6 ± 1.816 | |
| Perlakuan 3 | 21.8 ± 2.387 | |

Berdasarkan tabel 5.2 di atas, didapatkan *p-value* sebesar 0,001, nilai *p-value* <0,05 sehingga dari pengujian ini terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah folikel atretik masing-masing perlakuan. Untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan rata-rata jumlah folikel atretik, dilakukan uji *post hoc test* dengan menggunakan uji Tukey HSD. Hasil pengujian Tukey HSD dapat dilihat pada tabel 5.3 dan 5.4

Tabel 5.3 Uji Tukey HSD Jumlah Folikel Atretik

| <i>p-value</i> | K(+1) | K(+2) | P1 | P2 | P3 |
|----------------|-------|--------|-------|--------|--------|
| K(-) | 0.068 | 0.030* | 0.144 | 0.003* | 0.001* |
| K(+1) | | 0.999 | 0.999 | 0.765 | 0.425 |
| K(+2) | | | 0.971 | 0.929 | 0.654 |
| P1 | | | | 0.537 | 0.239 |
| P2 | | | | | 0.992 |

p-value<0,05 adalah bermakna (*).

K (-) adalah tikus yang tidak mendapatkan perlakuan, K (+) 1 adalah tikus yang diberikan DTL 25 gr/hari; K (+) 2 adalah tikus yang diberikan MSG 0,7 mg/gBB; P1 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,05 mg/gBB; P2 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,2 mg/gBB; dan P3 adalah tikus yang diberikan DTL+MSG 0,35 mg/gBB.

Tabel 5.4 Homogeneous Subsets Folikel Atretik

| Kelompok | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---------------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| Kontrol (-) | 5 | 11.6000 | |
| Perlakuan 1 | 5 | 17.0000 | 17.0000 |
| Kontrol (+) 1 | 5 | 17.8000 | 17.8000 |
| Kontrol (+) 2 | 5 | | 18.6000 |
| Perlakuan 2 | 5 | | 20.6000 |
| Perlakuan 3 | 5 | | 21.8000 |
| Sig. | | .068 | .239 |

Dari hasil *post hoc test* dengan menggunakan uji Tukey HSD, pada perbandingan kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif 2, perlakuan 2, dan perlakuan 3, didapatkan *p-value* <0,05. Hal ini menunjukkan bahwa pemaparan MSG serta kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dalam berbagai dosis berdampak pada peningkatan jumlah folikel atretik secara signifikan. Sedangkan antara kelompok yang diberi perlakuan kombinasi DTL dan MSG berbagai dosis dengan tikus yang diberikan DTL atau MSG saja tidak terdapat perbedaan yang signifikan.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna jumlah folikel *de Graaf* pada masing-masing perlakuan. Namun secara umum terdapat kecenderungan penurunan jumlah folikel *de Graaf* pada kelompok yang diberikan perlakuan DTL, MSG serta kombinasi DTL dan MSG berbagai dosis dibandingkan dengan kontrol negatif. Jumlah rerata folikel *de Graaf* pada kelompok kontrol positif 1 (DTL) dan kontrol positif 2 (MSG 0,7mg/gBB) sama yaitu 1.8 ± 0.836 . Hal ini menunjukkan terdapat efek yang sama pada konsumsi diet tinggi lemak saja dan MSG dosis tinggi yaitu 0,7mg/gBB terhadap penurunan jumlah folikel *de Graaf*. Pada kelompok tikus yang mendapat perlakuan kombinasi diet tinggi lemak dan MSG 0,35mg/gBB menunjukkan penurunan jumlah folikel *de Graaf* dan hasilnya sama dengan kelompok tikus yang mendapat perlakuan diet tinggi lemak saja dan MSG 0,7mg/gBB. Ini membuktikan bahwa ketika MSG dosis rendah diberikan bersama dengan diet tinggi lemak akan menghasilkan efek yang sama terhadap penurunan jumlah folikel *de Graaf* dengan kelompok yang hanya diberikan diet tinggi lemak saja dan MSG dosis 0,7mg/gBB. Dalam penelitian ini juga didapatkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap peningkatan jumlah folikel atretik ($p=0,001$). Hal ini terutama terjadi pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif 2 (MSG 0,7mg/gBB), perlakuan 2 (DTL & MSG 0,2mg/gBB), dan perlakuan 3 (DTL & MSG 0,35 mg/gBB). Selain itu, terdapat

kecenderungan peningkatan jumlah folikel atretik pada tikus yang diberikan perlakuan kombinasi diet tinggi lemak dan MSG dengan dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang hanya mendapat diet tinggi lemak atau MSG dosis 0,7mg/gBB saja.

MSG dapat menghambat kerja FSH, sehingga aktivitas perkembangan dan pematangan folikel dari tahap folikel primordial menjadi folikel yang matur juga ikut terhambat. Akibatnya pada tikus yang diberi MSG, jumlah folikel *de Graaf* cenderung mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol. Gangguan hormonal akibat pengaruh MSG terutama adalah penurunan kadar FSH dan LH (Megawati dkk., 2005).

Obesitas yang disebabkan karena paparan diet tinggi lemak dapat menyebabkan penurunan pada pulsatile pelepasan LH (*pulsatile LH release*) dan menyebabkan penurunan sekresi LH melalui kelenjar pituitari. Hal ini ada kaitannya dengan peningkatan serum leptin pada tikus yang diberikan perlakuan diet tinggi lemak. Peningkatan serum leptin dapat mengganggu sintesis oestradiol pada ovarium yaitu dengan menghambat sintesis pregnenolon yang merupakan prekursor untuk oestradiol. Gangguan pada saat sintesis oestradiol dapat menyebabkan penurunan sekresi LH (Barkan dkk., 1999). Pada akhir fase folikuler, folikel *de Graaf* siap untuk diovulasikan dengan adanya lonjakan LH. LH menyebabkan peningkatan sekresi hormon steroid folikuler yang mengandung progesteron. Dalam beberapa jam, akan terjadi dua hal penting, dimana 2 kejadian ini penting untuk ovulasi: (1) Teka eksterna mulai melepaskan enzim proteolitik dari lisosom, dan ini menyebabkan melemahnya dinding folikel sehingga terjadi pembengkakan seluruh folikel dan degenerasi stigma. (2) Secara bersamaan, terjadi pertumbuhan pembuluh darah baru yang cepat pada

dinding folikel, prostaglandin (hormon yang menyebabkan vasodilatasi) disekresikan ke dalam jaringan folikel. Kedua efek ini menyebabkan pembengkakan folikel. Akhirnya, pembengkakan folikel dan degenerasi stigma menyebabkan pecahnya folikel, dengan keluarnya sel telur. Stigma adalah area kecil dibagian tengah kapsul folikuler (Guyton, 2006). Apabila tidak terjadi lonjakan LH (*LH-surge*) akibat pengaruh MSG maupun diet tinggi lemak akan menyebabkan terganggunya proses ovulasi. Oleh karena itu sebagian besar folikel yang sudah matur akan menjadi atretik sebelum terjadinya ovulasi (Megawati dkk., 2005).

Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Megawati dkk. (2005), dimana tikus yang diberikan MSG dosis 0,7 mg/gBB menunjukkan penurunan yang bermakna pada jumlah folikel *de Graaf*. Ini ada kaitannya dengan proses atresia suatu folikel. Menurut Williams dan Gregory (2012), atresia suatu folikel merupakan proses yang normal terjadi di ovarium. Setelah pembentukan antrum kecepatan pertumbuhan folikel akan bertambah. Atresia suatu folikel ovarium dapat terjadi setelah melewati tahap folikel sekunder, dengan insiden atresia tertinggi terjadi ketika mendekati tahap folikel matur (folikel *de Graaf*) yaitu 50-77%. Hal inilah yang menyebabkan jumlah folikel *de Graaf* pada kelompok kontrol negatif sedikit, meskipun tidak diberikan perlakuan apapun, karena atresia dapat terjadi di seluruh tahap perkembangan folikel (folikulogenesis) (Williams dan Gregory, 2012).

Jumlah folikel *de Graaf* yang sedikit menunjukkan jumlah folikel yang siap untuk diovulasikan juga menurun karena banyak folikel yang mengalami atresia. Pemberian MSG dapat mempengaruhi ovarium secara keseluruhan dan saling berhubungan. Gangguan yang menyebabkan penurunan jumlah folikel

sekunder akan menurunkan jumlah folikel *de Graaf* dan kemudian mempengaruhi penurunan jumlah korpus luteum. Jumlah korpus luteum yang menurun menunjukkan jumlah folikel yang berovulasi juga sedikit serta sebagai indikator terganggunya proses ovulasi pada ovarium (Megawati dkk., 2005). MSG selain menyebabkan gangguan pada tahap perkembangan folikel juga menyebabkan kongesti pembuluh darah pada arteri maupun vena di medula ovarium. Kongesti atau pelebaran pembuluh darah arteri ovarium dapat menyebabkan degenerasi folikel primer dan folikel *de Graaf* di stroma ovarium serta peningkatan folikel atretik. Pembuluh darah arteri ovarium merupakan cabang dari aorta pada abdomen yang membawa aliran darah untuk memberi nutrisi pada ovarium (Awasum dkk., 2008).

Pemberian MSG dapat menyebabkan gangguan hormonal pada ovarium tikus. Ion glutamat dalam siklus portal akan mempengaruhi hipotalamus dalam memproduksi GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*) yang selanjutnya akan mengganggu hipofisis anterior dalam memproduksi FSH dan LH. Menurut Burkitt (1995), pada awal perkembangan folikel zona granulosa berproliferasi dengan cepat dibawah pengaruh FSH. Gangguan hormonal ini akan menyebabkan proses perkembangan dan pematangan folikel terganggu dan sebagian besar folikel menjadi atretik. Peningkatan jumlah folikel atretik terjadi akibat terhambatnya pematangan folikel ovarium mulai dari tahap folikel primer sampai folikel *de Graaf* yang siap diovulasikan. Atresia merupakan suatu proses normal yang umum terjadi selama tahap perkembangan dan pematangan folikel ovarium, namun pemberian MSG diketahui dapat meningkatkan terjadinya atresia suatu folikel (Megawati dkk., 2005).

Wang dkk. (2014) menyebutkan bahwa tikus putih betina yang dibuat obesitas karena perlakuan diet tinggi lemak (lemak babi 20%) selama 18 minggu menunjukkan jumlah folikel atretik yang lebih banyak daripada kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan karena obesitas dapat mengawali terjadinya proses apoptosis folikel. Diet tinggi lemak juga dapat merangsang aktivasi folikel primordial, meningkatkan perkembangan dan kematangan folikel ovarium, sehingga mempercepat laju kehilangan folikel. Usia kesuburan reproduksi wanita dikaitkan dengan cadangan folikel ovarium yang tersisa dan keteraturan siklus menstruasi (Anzalone dkk., 2001). Penelitian lain yang dilakukan oleh Aye dkk. (2014) menyebutkan bahwa diet tinggi lemak dapat mempercepat laju kehilangan folikel karena adanya proses inflamasi pada organ reproduksi sejalan dengan meningkatnya inflamasi pada berbagai organ lain. Asupan lemak, trigliserida, dan kolesterol dari luar yang terlalu berlebihan terutama yang terjadi pada orang obesitas dan kelebihan nutrisi akan menyebabkan peningkatan sintesis sel lemak. Akumulasi lemak yang berlebihan pada sel dapat mengawali terjadinya toksisitas spesifik jaringan dan akhirnya akan menyebabkan abnormalitas atau gangguan regulasi sel dan gangguan fungsi organ. Keadaan ini yang kemudian disebut toksisitas lipid seluler. Akumulasi lemak yang berlebihan ini juga menyebabkan peningkatan asam lemak bebas dan stress oksidatif, selanjutnya akan meningkatkan peroksidasi lipid yang bersifat sitotoksik dan sangat reaktif. Kondisi ini berakibat pada gangguan fungsional organel sel (Linda dkk., 2010).

Keterbatasan dari penelitian ini adalah perlu dipelajari lebih lanjut mengenai mekanisme apoptosis yang terjadi pada folikel atresia dan perlu diteliti juga profil hormon ovarium untuk mengetahui kaitannya dengan gangguan proses folikulogenesis akibat perlakuan yang diberikan.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

- 7.1.1 Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis mempengaruhi penurunan jumlah folikel *de Graaf* dan peningkatan jumlah folikel atretik pada tikus wistar *Rattus norvegicus*.
- 7.1.2 Pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis memiliki pengaruh yang sama pada pemberian diet tinggi lemak saja dan MSG dosis tinggi terhadap jumlah folikel *de Graaf* dan atretik.

7.2 Saran

- 7.2.1 Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan perbedaan lama paparan dan usia tikus untuk mengetahui efek pemberian kombinasi diet tinggi lemak dan MSG terhadap organ dalam termasuk ovarium.
- 7.2.2 Perlu diteliti lebih lanjut mengenai mekanisme apoptosis pada folikel akibat paparan diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis.
- 7.2.3 Penelitian pengaruh kombinasi diet tinggi lemak dan MSG berbagai dosis dapat dilakukan pada tikus betina yang hamil untuk mengetahui efek yang ditimbulkan pada keturunannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar B., 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*, Adabia Press, Jakarta, hal. 1-47.
- Andarwulan N, Nuraida L, Madanijah S, Lioe HN, and Zulaikhah. 2011, Free glutamate content of condiment and seasonings and their intake in Bogor and Jakarta, Indonesia. *Food Nutl' Sci* 2:764-769.
- Anzalone CR, Hong LS, Lu JK, et al. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long Evans rat. *Biol Reprod*. 2001;64(4):1056–62.
- Awasum C. A., Hassan A. Z., Remi-Adewumi B. D., Achiz C. R., Ibrahim N. D., Raoul D. K., et al. 2008. Neovascularisation of The Ovary Post Ligation of Ovarian Vessels in Bitches. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 7 (2): 7-9.
- Aye IL, Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Dudley DJ, Jansson T, Powell TL. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. *Biol Reprod* 2014; 90:129.
- Balen HA, Gerrard SC, Roy H, Richard SL. 2005. *Polycystic Ovary Syndrome: A Guide To Clinical Management*. Taylor & Francis.
- Bannai, M. dan Torii, K. Digestive Physiology of the Pig Symposium: Detection of Dietary Glutamate via Gut-Brain Axis. *Journal of Animal Science*, 2013, 91 (5): 1974-81.
- Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology*. 1999;140:1731-1738.
- Burkitt, H.G., Heath J.W., and Young B., 1995. *Histologi Fungsional*, Edisi 3, Penerjemah: J. Tambojang, EGC, Jakarta.
- Byers, Shannon L., Michael V. Wiles, Sadie L. Dunn, Robert A. Taft. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35538.
- Collison K.S., Makhoul N.J., Inglis A., Al-Johi M., Zaidi M.Z., Maqbool Z., et al. Dietary Trans-Fat Combined with Monosodium Glutamate Induces Dyslipidemia and Impairs Spatial Memory. *Physiology & Behavior*, 2010a, 99 (3): 334-42.

- Das, R.S. and Ghosh, S.K. Long Term Effects of Monosodium Glutamate on Spermatogenesis Following Neonatal Exposure in Albino Mice--A Histological Study. *Nepal Medical College Journal*, 2010, 12(3): 149-53.
- Dokraz A., Baredziak L., Blaine J., Syrop C., VanVoorhis B.J., and Sparks A. Obstetric outcomes after in vitro fertilization in obese and morbidly obese women. *Obstet Gynecol*, 2006, 108 (1): 61-9.
- Donatus, I.A. 1996. *Petunjuk Praktikum Toksikologi*, Edisi 6, Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, hal. 21, 27, dan 29.
- Eweka A.O., Abieyuwa E., Om'iniabo, F.A.E. Histological studies of the effects of monosodium glutamate of the fallopian tubes of adult female Wistar rats. *North American Journal of Medical Sciences*, 2010, 2 (3): 146-149.
- Eweka, A. O. and Om'iniabo, F.A.E. Histological Studies of the Effects of Monosodium Glutamate on the Ovaries of Adult Wistar Rats. *Annal of Medical & Health Sciences Research*, 2011, 1 (1): 37-43.
- Eweka, A.O., Eweka, A., and Om'iniabo, F.A.E. Histological Studies of the Effects of Monosodium Glutamate of the Fallopian Tubes of Adult Female Wistar Rats. *North American Journal of Medical Sciences*, 2010, 2 (3): 146-9.
- Feng Li X, Lin Y.S., Kinsey-Jones J.S., O'Byrne K.T. High-Fat Diet Increases LH Pulse Frequency and Kisspeptin-Neurokinin B Expression in Puberty-Advanced Female Rats. *Endocrinology*, 2012, 153: 4422-4431.
- Geha, R.S. Beiser A., Ren C., Patterson R., Greenberger P.A., Grammer L.C., et al. Review of Alleged Reaction to Monosodium Glutamate and Outcome of a Multicenter Double-Blind Placebo-Controlled Study. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130 (4S Suppl): 1058S-62S.
- George, Binu and Bassouvalingam Kumaran. Protective Effect of Nigella Sativa Oil and Astaxanthin on Monosodium Glutamate Induced Dyslipidemia in Rats. *International Archive of Applied Sciences and Technology*, 2015, 6 (4): 1-7.
- Guyton, Arthur C. 2006. *Textbook of Medical Physiology 11th Ed.* Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS.
- Hanafiah, K. A. 2012. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Edisi Ketiga. Jakarta: Raja Grafindo Pustaka.
- Handayani, D. 2012. Prevention and Treatment of High Fat-Diet-Induced by Dietary Intake of Shitake and Oat. *Health and Behavioural Faculty*. Wollogong. Wollogong, Pdtl.

- He, K., Du, S., Xun, P., Sharma, S., Wang, H., Zhai, F. & Popkin, B. Consumption of Monosodium Glutamate in Relation to Incidence of Overweight in Chinese Adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 93 (6): 1328-36.
- Heriansyah, Teuku. Pengaruh Berbagai Durasi Pemberian Diet Tinggi Lemak Terhadap Profil Lipid Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) Jantan. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 2013, 13 (3): 144-150.
- Husarova, Veronika and Daniela Ostatnikova. Monosodium Glutamate Toxic Effects and Their Implications for Human Intake: A Review. *JMED Research*, 2013, 2013: 1-12.
- Junquiera, L.C., J. Carneiro, dan O. Kelley. 1997. *Histologi Dasar*. Edisi kedelapan. Penerjemah: Harsojo. Surabaya: Airlangga University Press.
- J.Mustafa, S., Tan A.S., Hadeel A.Y., Bushra H.M., and Ali I.M. Effect of Monosodium Glutamate on Mice Ovaries and The Possible Protective Role of Vitamin C. *Annals of Applied Bio-Sciences*, 2015, 2 (4): A100-A105.
- Laboratorium Patologi Anatomi. 2017. *Prosedur Pengerjaan Preparat Histo Patologi*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Linda LW, Kylie RD, Xing Y, et al 2010. Oocytes Exhibit Lipid Accumulation, Endoplasmic Reticulum Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Apoptosis in Response to High Fat Diet. *Biol Reprod*, 83: 185.
- Megawati, D., Sutarno, dan Shanti L. Siklus Estrus dan Struktur Histologis Ovarium Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Setelah Pemberian Monosodium Glutamat (MSG) Secara Oral. *BioSMART*, 2005, 7 (1): 47-52.
- Mescher, Anthony L. 2013. *Janqueira's Basic Histology Text and Atlas*, McGraw-Hill Education, US.
- Murray R.K., Granner D.K., Rodwell V.W., 2009. *Biokimia Harper*, Edisi 27., EGC, Jakarta.
- Ogbuji, Queen Chidinma. Obesity and Reproductive Performance in Women. *African Journal of Reproductive Health*, 2010, 14 (3): 143-152.
- Oladipo, I. C., Adebayo E.A., Kuye O.M. Effects of Monosodium Glutamate in Ovaries of Female Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, 4 (5): 737-745.
- Paccola, C. C., C. G. Resende, T. Stumpp, S. M.Miraglia, I. Cipriano. The Rat Estrous Cycle Revisited: A Quantitative and Qualitative Analysis. *Anim. Reprod.*, 2013, 10 (4): 677-683.

- Pieper, M. J., Flor P. J., Dinan T. G., and Cryan J. F. Exiting Times Beyond The Brain: Metabotropic Glutamate Receptors in Peripheral and Non-Neural Tissues. *Pharmacol Rev.*, 2011, 63: 35-58.
- Reeves, P.G. Compound of The AIN-93 Diets as Improvement of AIN-76A Diets. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127: 8385-8415.
- Roman-Ramos, R., Almanza-Perez J.C., Garcia-Macedo R., Blancas-Flores G., Fortis- Barrer A., Jasso, E. I., *et al.* Monosodium Glutamate Neonatal Intoxication Associated with Obesity in Adult Stage is Characterized by Chronic Inflammation and Increased mRNA Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2011, 108 (6): 406-13.
- Ross, Michael H. and Wojciech Pawlina. 2011. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology 6th ed*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Sherwood, Lauralee. 2011. *Human Physiology: From Cells to Systems 6th Ed*, EGC, Jakarta.
- Silverthorn, Dee Unglaub. 2010. *Human Physiology: An Integrated Approach*. United States of America: Pearson Education.
- Smith J.B. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Soulis G, Kitraki E, and Gerozissis K. Early Neuroendocrine Alterations in Female Rats Following a Diet Moderately Enriched in Fat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2005, 25: 869–880.
- Speroff L, Marca AF. 2011. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Edisi Ke-8*. Baltimore, USA: William Lippincot and Wilkins.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik Cetakan ke-2*, PT Gramedia Pustaka, Jakarta.
- Sukawan, U. Y. Efek Toksik Monosodium Glutamat (MSG) Pada Binatang Percobaan. *J. Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia Jakarta*, 2008, 3: 306-314.
- Suyatna, F.D. Hipolipidemik. Dalam: Gunawan, S.G., R. Setiabudi, Nafrialdi, Elysabeth (Ed.). 2007. *Farmakologi dan Terapi*, Ed. Ke-5, Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 373-385.
- Uke Y.S. Efek Toksik Monosodium Glutamat (MSG) pada binatang percobaan. *Sutisning*, 2008, 3 (2): 306- 314.

- Walker H.W., Cheng J. FSH and Testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 2005, 130 (1): 15-28.
- Wang Na, Li-Li L., Jin-Jie Xu, Ming-Yan Xu, Xing-Mei Z., Xiao-Ling Z., *et al.* Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2014, 63 (2014): 94-103.
- Widiartini, W., Siswati, E., Setiyawati, A., Rohmah, I.M., Prasetyo E. 2013. Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Tersertifikasi Dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium, (Online)(<http://artikel.dikti.go.id/index.php/PKMK/article/download/149/150> , diakses 10 Mei 2017).
- Wijayasekara, Kaushalya dan Wansapala, Jagath. 2017. Uses, effects and properties of monosodium glutamate (MSG) on food & nutrition. *International Journal of Food Science and Nutrition*. Vol. 2(3): 132-143.
- Williams, Carmen J. dan Gregory F. Erickson. 2012. *Morphology and Physiology of The Ovary*, (Online) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/#NBK278951_dtls, diakses 8 April 2017).
- Xu, C., HaiYan Z., JianHong Z., and Ge Jing. The pharmacological effect of polysaccharides from *Lentinus edodes* on the oxidative status and expression of VCAM-1mRNA of thoracic aorta endothelial cell in high-fat-diet rats. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74 (3):445-450.