



**PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP
JUMLAH FOLIKEL PADA TIKUS (*Rattus Norvegicus*) GALUR WISTAR
BETINA YANG DIBERI RHODAMIN B**

TUGAS AKHIR

**Untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh gelar sarjana kebidanan**



Oleh:

Elsa Amelya

NIM 15507060011100

PROGRAM STUDI SARJANA KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C DAN VITAMIN E TERHADAP JUMLAH FOLIKEL PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR BETINA YANG DIBERI RHODAMIN B

Oleh:
Elsa Amelya
155070600111007

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

Penguji-I

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardiono, DTM&H., M.Sc., Sp.Par.K.

NIP. 195204101980021001

Pembimbing-I/Penguji-II,

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

NIP. 197511252005012001

Pembimbing-II/ Penguji-III

Lilik Indahwati, SST., M.Keb.

NIK. 2016118303232001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Kebidanan



Linda Ratna Wati., SST., M.Kes

NIP. 198409132014042001



KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Pengaruh Pemberian Vitamin C Dan Vitamin E Terhadap Jumlah Folikel pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar Betina yang diberi Rhodamin B” ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh peredaran Rhodamin B dilingkungan masyarakat dan minimnya informasi yang didapat tentang Rhodamin B. Solusi mencegah efek Rhodamin B dapat menggunakan suplemen vitamin C dan vitamin E yang bisa menghambat kerusakan sel akibat reaksi oksidatif.

Dengan selesainya tugas akhir ini penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada ;

1. Dr. Husnul Khotimah, S.Si.,M.Kes sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bantuan dan bimbingannya berupa ide dan gagasan serta selalu membimbing untuk dapat menulis dengan baik, senantiasa memberikan semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
2. Lilik Indahwati, S.ST., M.Keb sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan senantiasa memberikan semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
3. Linda Ratna Wati S.ST., M.Kes sebagai Ketua program studi sarjana Kebidanan yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di program studi sarjana kebidanan di fakultas kedokteran univeristas brawijaya
4. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med,Sp.A(K) sebagai Dekan fakultas kedokteran universitas brawijaya yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di fakultas kedokteran univeristas brawijaya



5. Segenap anggota tim pengelolah tugas akhir FKUB yang telah membantu penulis melancarkan urusan administrasi sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan lancar
6. Yang tercinta ibunda Shalihatul Hasanah dan ayahanda Edwaindo Fromizos serta adik Diky Maulana atas segala pengertian dan kasih sayangnya.
7. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat dituliskan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala sara dan krtiknya yang membangun. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 21 Mei 2019

Penulis



ABSTRAK

Amelya, Elsa. 2019. **Pengaruh Pemberian Vitamin C Dan Vitamin E Terhadap Jumlah Folikel Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar Betina yang diberi Rhodamin B**. Tugas Akhir, Program S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si M.Kes, (2) Lilik Indahwati, S.ST, M.Keb

Infertilitas menjadi salah satu masalah dalam sistem kesehatan reproduksi. Salah satu faktor yang mempengaruhi infertilitas berasal dari sesuatu yang kita konsumsi seperti makanan. Produsen makanan sebagian besar mencampurkan zat berbahaya seperti Rhodamin B (RB). RB termasuk senyawa xenobiotik (senyawa asing bagi tubuh) yang memiliki produk samping berupa radikal bebas. Solusi untuk menangani masalah radikal bebas perlu adanya antioksidan tambahan dari luar tubuh. Tujuan penelitian ini membuktikan pengaruh pemberian Vitamin C (VC), Vitamin E (VE) dan kombinasi keduanya (VCE) terhadap jumlah folikel tikus galur wistar betina yang diberi rhodamin B (RB). Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium farmakologi FK UB, menggunakan hewan coba tikus galur wistar betina yang dibagi menjadi 5 kelompok : K(-) , K (+), VC, VE dan VCE. Tikus diberi perlakuan selama 36 hari dengan dosis Rhodamin B 90mg/KgBB, vitamin C 600mg/KgBB vitamin E 40IU/KgBB selanjutnya tikus diterminasi dan diambil organ ovariumnya untuk dilakukan pewarnaan HE. Folikel dilihat menggunakan mikroskop Olympus 10 dengan perbesaran 400x. Hasil analisis pada penelitian ini didapatkan data bersifat homogen ($P>0,05$), data terdistribusi normal ($P>0,05$), hasil uji Anova ($P>0,05$). Hasil pengamatan dari penelitian ini terdapat pengaruh kenaikan dan penurunan pemberian vitamin C dan vitamin E terhadap jumlah folikel tikus yang diberi rhodamin B namun secara statistik tidak terdapat hasil yang signifikan

Kata kunci : Rhodamin B, Vitamin C, Vitamin E, Jumlah folikel Infertilitas



ABSTRAK

Amelya, Elsa. 2019. **Effect of Giving Vitamin C and Vitamin E on Follicle Amount in mice (*Rattus Norvegicus*) Wistar female who was given Rhodamin B.** Final Assignment, Midwifery Program, Faculty Of Medicine, Brawijaya University, Supervisors: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si M.Kes, (2) Lilik Indahwati, S.ST, M.Keb

Infertility is one of the problems in the reproductive health system. One of the factors that affect infertility comes from something we consume like food. Food producers that mostly mix harmful substances such as Rhodamin B (RB). RB includes xenobiotik compounds (foreign compounds for the body) that have a by-product of free radicals. Solutions to overcome the problem of free radicals require additional antioxidants from outside the body. The aim of this study was to prove the effect of giving Vitamin C (VC), Vitamin E (VE) and a combination of both (mice)). This research is an experimental research in the pharmacology laboratory brawijaya university, using experimental animals female wistar rats which are divided into 5 groups: K (-), K (+), VC, VE, and VCE. Mice were treated for 36 days with a dose of Rhodamin B 90 mg / KgBB, vitamin C 600 mg / KgBB of vitamin E 40 IU / KgBB then the mice were removed surgically and their ovarian organs were taken to stain HE. Follicles are seen using an Olympus 10 microscope with 400x magnification. The results of the analysis in this study obtained homogeneous data ($P > 0.05$), data were normally distributed ($P > 0.05$), ANOVA test results ($P > 0.05$). the results of this study were that there was an effect of increasing and reducing the administration of vitamin C and vitamin E to the number of follicles given rhodamine B but statistically there were no significant results.

Keywords: Rhodamin B, Vitamin C, Vitamin E, Number of follicles



DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| Halaman Pengesahan | ii |
| Kata Pengantar | iii |
| Abstrak | v |
| Daftar Tabel | ix |
| Daftar Gambar | x |
| Daftar Singkatan | xi |
| Daftar Lampiran | xii |
| BAB 1 PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| 1.4.1 Manfaat teoritis | 3 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis | 3 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Rhodamin B | 4 |
| 2.1.1 Pengertian dan karakteristik Rhodamin B | 4 |
| 2.1.2 Rhodamin B sebagai senyawa xenobiotik | 5 |
| 2.2 Rhodamin B Meningkatkan Radikal Bebas | 6 |
| 2.2.1 Radikal Bebas | 6 |
| 2.2.2 Stress oksidatif menyebabkan apoptosis | 8 |
| 2.3 Antioksidan | 10 |
| 2.3.1 Vitamin C | 10 |
| 2.3.2 Vitamin E | 11 |
| 2.3.3 Kombinasi Vitamin C dan Vitamin E | 12 |
| 2.4 Tikus Sebagai Hewan Coba | 12 |
| 2.4.1 Anatomi Ovarium Dan Perkembangan Folikel | 13 |
| 2.4.2 Sistem Reproduksi | 15 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN | |
| 3.1 Kerangka Konsep | 18 |
| 3.2 Hipotesis | 19 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | |



| | |
|---------------------------------------|----|
| 4.1 Rancangan Penelitian..... | 20 |
| 4.2 Populasi dan Sempel..... | 20 |
| 4.2.1 Besar Sampel | 20 |
| 4.2.2 Pembagian Kelompok | 21 |
| 4.3 Variabel Penelitian | 22 |
| 4.3.1 Variabel Bebas | 22 |
| 4.3.2 Variabel Tergantung | 22 |
| 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian | 23 |
| 4.5 Kriteria Penelitian..... | 23 |
| 4.5.1 Kriteria Inklusi | 23 |
| 4.5.2 Kriteria Eksklusi | 23 |
| 4.6 Bahan Dan Alat Penelitian..... | 23 |
| 4.6.1 Bahan Penelitian..... | 23 |
| 4.6.2 Alat Penelitian | 24 |
| 4.7 Definisi Operasional..... | 25 |
| 4.8 Prosedur Penelitian | 27 |
| 4.8.1 Cara Kerja..... | 27 |
| 4.9 Analisis Data | 31 |
| 4.10 Alur Penelitian..... | 33 |

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

| | |
|---|----|
| 5.1 Proses Dan Hasil Penelitian | 34 |
| 5.2 Gambaran Perkembangan Folikel | 36 |
| 5.3 Hasil Analisis Data | 38 |

BAB 6 PEMBAHASAN

| | |
|---|----|
| 6.1 Perbedaan Jumlah Folikel Perlakuan diberikan Rhodamin B dengan Tidak diberikan Rhodamin B | 40 |
| 6.2 Perbedaan Pemberian Rhodamin B dengan Tikus yang diberi Vitamin C Vitamin E dan Kombinasinya..... | 41 |
| 6.3 Keterbatasan Peneliti..... | 44 |

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

| | |
|---------------------|----|
| 7.1 Kesimpulan..... | 45 |
| 7.2 Saran | 45 |

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Rantai cabang pada struktur vitamin E 11



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1 Rumus Molekul Rhodamin B..... | 5 |
| Gambar 2.2 Sumber endogen dan eksogen penyebab radikal bebas..... | 7 |
| Gambar 2.3 Mekanisme stress mengaktifkan p53 untuk apoptosis sel..... | 8 |
| Gambar 2.4 Tikus Putih <i>Rattus norvegicus</i> | 12 |
| Gambar 2.5 Perkembangan Folikel di Ovarium..... | 15 |
| Gambar 5.1 Gambaran Histologi Folikel..... | 36 |
| Gambar 5.2 Gambaran Pewarnaan Folikel..... | 37 |
| Gambar 5.3 Gambaran Histogram Jumlah Folikel..... | 38 |



DAFTAR SINGKATAN

BPOM : Badan Pengawasan Obat dan Makanan

FSH : *Follicle Stimulating Hormon*

LH : *Luteinizing Hormon*

DNA : *Deoxyribo Nucleic Acid*

SOD : *Super Oksida Dismutase*

MDA : *Melondialdehid*

ROS : *Reactive Oxygen Specific*

VC : Vitamin C

VE : Vitamin E

RB : Rhodamin B

Nf-KB : *Nuclear Faktor Kappa B*

APAF-1 : *Apoptotic Protease Activating Faktor -1*



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan..... | 51 |
| Lampiran 2 Hasil Analisis Data..... | 52 |
| Lampiran 3. Surat Kelaikan Etik..... | 55 |
| Lampiran 4. Dokumentasi..... | 56 |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesehatan saat ini menjadi salah satu masalah penting yang harus diperhatikan, menurut Depkes Republik Indonesia tahun 36 tahun 2009 yang dimaksud dengan kesehatan yaitu keadaan sehat, baik secara fisik, mental, spritual maupun sosial yang memungkinkan setiap orang untuk hidup produktif secara sosial dan ekonomis. Salah satu masalah kesehatan yaitu masalah kesehatan reproduksi. Kesehatan reproduksi adalah keadaan sejahtera fisik, mental dan sosial yang menyeluruh dan tidak tidak semata-mata terbebas dari penyakit atau kecacatan dalam semua hal berhubungan dengan sistem reproduksi dan fungsi serta prosesnya (Kemenkes,2010).

Infertilitas menjadi salah satu masalah dalam sistem reproduksi saat ini. Infertilitas merupakan ketidakmampuan seseorang menghasilkan keturunan meskipun memiliki hubungan seksual yang aktif dan sedang tidak menggunakan alat kontrasepsi. Salah satu faktor yang mempengaruhi infertilitas dapat berasal dari sesuatu yang kita konsumsi seperti makanan. Maraknya produsen makanan yang mencampurkan zat berbahaya pada makanan yang seharusnya tidak dikonsumsi oleh manusia seperti Rhodamin B (Anwar &Ayesha, 2016).

Menurut survey BPOM (Badan Pengawas Obat dan Makanan) pada tahun 2011 yang dilakukan pada 866 sekolah dari 30 kota di Indonesia, jajanan anak sekolah yang tidak memenuhi standar mutu dan keamanan mengandung bahan yang dilarang seperti Rhodamin B. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) menemukan dari 3.925 sampel produk pangan jajanan anak sekolah yang terdiri dari es, minuman berwarna merah,



agaragar, kudapan dan makanan ringan berwarna merah diketahui sebanyak 40 (1,02%) sampel mengandung Rhodamin B.

Rhodamin B merupakan pewarna sintetik memiliki ikatan dengan clorin (Cl) yang merupakan senyawa halogen bersifat reaktif (Restu & Bambang, 2017). Rhodamin B juga termasuk senyawa xenobiotik (senyawa asing bagi tubuh) yang dapat menghasilkan radikal bebas (Roosdiana dkk., 2017). Meningkatnya radikal bebas didalam tubuh dapat meyebabkan apoptosis sel granulosa dan mengganggu perkembangan folikel sehingga terjadi penurunan jumlah (Setiyono dkk., 2015).

Salah satu solusi untuk menangani masalah radikal bebas perlu adanya konsumsi antioksidan tambahan. Beberapa antioksidan antara lain yaitu vitamin C dan vitamin E (Asadi dkk., 2013). Vitamin C adalah pertahanan pertama terhadap radikal bebas didalam sel dengan cara mendonorkan satu ion hidrogennya. Vitamin E sebagai antioksidan mampu memutus lipid peroksida didalam membran sel (Winarsih, 2007). Menurut penelitian suciati tahun 2014 paparan Rhodamin B dengan dosis selama 36 hari dengan dosis 4,5 mg/ 200BB, 9mg/200BB dan 18mg/ 200BB terbukti signifikan menurunkan jumlah folikel di ovarium. Sedangkan, penelitan yang dilakukan Laili pada tahun 2015 kombinasi vitamin C dan vitamin E dengan dosis vitamin C 0,2 mg/grBB, 0.4 mg/grBB, 0,04 mg/grBB dan vitamin E 0,04IU/grBB signifikan menurunkan kadar MDA (melondialdehid) dan meningkatkan kadar SOD (superoksida dismutase) didalam ovarium dengan paparan Rhodamin B 18mg/200gBB. Berdasarkan penjelasan diatas maka peneliti tertarik untuk membahas pengaruh pemberian vitamin C, vitamin E dan kombinasi vitamin C dan E pada Rhodamin tikus putih (*Rattus Norvegicus*) betina yang diberi Rhodamin B.



1.2 Rumusan masalah

Apakah ada pengaruh pemberian vitamin C, vitamin E dan kombinasi keduanya terhadap peningkatan jumlah folikel pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar betina yang dipapar Rhodamin B?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Membuktikan bahwa ada hubungan pemberian rhodamin B terhadap penurunan jumlah folikel pada tikus *b(Rattus nurvegicus)* galur wistar betina.

1.3.2 Membuktikan bahwa ada hubungan pemberian vitamin C, vitamin E maupun kombinasi keduanya terhadap peningkatan jumlah folikel pada tikus (*Rattus nurvegicus*) galur wistar yang dipapar rhodamin B

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1.4.1.1 Menambah ilmu pengetahuan tentang manfaat pemberian antioksidan vitamin C, vitamin E dan kombinasi keduanya dalam mengurangi efek penurunan jumlah folikel akibat paparan Rhodamin B

1.4.1.2 Sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian antioksidan vitamin C, vitamin E maupun kombinasi keduanya dalam mengurangi efek penurunan jumlah folikel akibat paparan Rhodamin B

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi awal kepada masyarakat tentang manfaat pemberian antioksidan vitamin C, vitamin E maupun kombinasi keduanya dalam mengurangi efek penurunan jumlah folikel akibat paparan Rhodamin



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rhodamin B

2.1.1 Pengertian dan Karakteristik Rhodamin B

Rhodamin B adalah zat pewarna sintetik, tidak berbau berbentuk kristal hijau atau serbuk ungu kemerah yang mudah larut dalam air dan menghasilkan warna merah kebiru-biruan. Rhodamin B pada bidang industri biasa digunakan sebagai pewarna tekstil, kain dan kertas (Paulina,2011). Rhodamin B termasuk zat pewarna yang dilarang untuk dikonsumsi dan dinyatakan sebagai bahan berbahaya menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor : 239/ Menkes/ Per/ V/ 1985. Rhodamin B menyebabkan iritasi pada hati, lambung, gangguan reproduksi serta bersifat karsinogenik penyebab kanker jika terpapar dalam jangka panjang (Febrina;dkk, 2017). Akan tetapi, meskipun sudah dinyatakan menjadi bahan yang berbahaya untuk dikonsumsi penggunaan Rhodamin B seringkali ditemukan dalam bahan pangan yang disebabkan ketidaktahuan masyarakat dan harganya yang relatif murah (Cahyadi,2012).

Rhodamin B juga dapat menimbulkan toksik pada ovarium, penurunan jumlah folikel primer, sekunder dan folikel degraft (Safitri *et al.*, 2015). Menurut penelitian suciati tahun 2014 paparan Rhodamin B dengan dosis selama 36 hari dengan dosis 4,5 mg/ 200BB, 9mg/200BB dan 18mg/ 200BB mempunyai hasil signifikan menurunkan jumlah folikel di ovarium.

2.2 Rhodamin B Meningkatkan Radikal Bebas

2.2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul, atom atau gugus yang memiliki 1 atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif dan radikal. Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau reactive oxygen species (ROS) dan reactive nitrogen species (RNS). Reactive Oxygen Species sebagian besar merupakan hasil metabolisme sel normal di dalam tubuh (ROS Endogen) dan sebagian kecil merupakan paparan dari zat-zat lain atau radikal-radikal dari luar tubuh (ROS eksogen) yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi atau peradangan (Parwata,2016)

ROS endogen merupakan respon fisiologis dari hasil metabolisme sel-sel normal tubuh seperti misalnya metabolisme karbohidrat dan protein. Paparan dari luar tubuh merupakan oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus. Reactive Oxygen terdiri dari superoksida (O_2^*), hidroksil (OH^*), peroksil (ROO^*), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), oksida nitrit (NO^*), peroksinitrit ($ONOO^*$) dan asam hipoklorit ($HOCl$). Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil (OH^*). Radikal hidroksil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. Radikal bebas bersifat sangat reaktif karena memiliki sifat cenderung menarik atau merusak molekul dan senyawa lain untuk mencapai kestabilan (Parwata,2016). Target utama radikal bebas adalah lipid, protein, asam lemak jenuh,

menginisiasi terjadinya apoptosis. Sedangkan, P53 juga dapat memicu ketidakseimbangan antara bcl (antiapoptosis) dan bax (proapoptosis). Bax akan melepaskan sitokrom c pada mitokondria, sitokrom yang terlepas dari mitokondria di dalam plasma berikatan dengan APAF-1 yang selanjutnya akan menyebabkan kasade sampai menjadi apoptosis. kasade adalah kunci perantara apoptosis pada jaringan (Gillham *et al*, 2007; Syamsul, 2011).

Stess oksidatif pada ovarium mengakibatkan apoptosis sel granulosa. Stress oksidatif di ovarium memicu aktifnya casade faktor 9, casade 3 dan bax (proapoptosis) sebagai pemicu terjaidnya apoptosis. Sel granulosa adalah sel berbentuk kuboid yang mengililingi folikel berfungsi sebagai suplai nutrisi bagi folikel muda yang sedang aktif melakukan pembelahan. Saat folikel primer mengalami proses pembelahan maka membutuhkan energi dari glukosa, asam piruvat dan asam laktat yang akan diberikan melalui sel granulosa (Suprihatin,2008) Jika sel granulosa mengalami apoptosis maka akan terjadi penurunan kualitas dan terhambatnya pematangan pada oosit yang dapat berpengaruh pada penurunan jumlah folikel (Kim *et al*,2011). Penyebab apoptosis sel granulosa juga menyebabkan ketidakseimbangan antara estrogen, progesterone dan FSH LH sehingga dapat mempengaruhi siklus menstruasi pada wanita. Saat difase folikuler estrogen dalam keadaan tinggi untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan folikel tetapi saat sel granulosa apoptosis estrogen akan menurun dan menyebabkan terganggunya fase folikuler yang pada manusia menjadi memanjang atau memendeknya siklus menstruasi (Guyton,2016)





2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Murray *et al*, 2012).

2.3.1 Vitamin C

A) Pengertian dan Karakteristik

Vitamin C merupakan salah satu anti oksidan berbentuk 3-oxo-L-gulofuranolactone. Vitamin C biasanya bersumber dari buah dan sayur, ekstrak alami maupun suplemen. Vitamin C berbentuk serbuk kristal berwarna putih atau agak kekuningan yang mempunyai rasa asam. Vitamin C mempunyai berat molekul 175,13 dan rumus molekul $C_6H_6O_6$. Vitamin C larut dalam alkohol tetapi tidak larut dalam kloroform eter dan benzena (Winarsih, 2007)

B) Mekanisme Kerja Vitamin C

Vitamin C merupakan antioksidan larut air yang menjadi pertahanan pertama terhadap stress oksidatif didalam plasma dan sel. Vitamin C mampu menghilangkan senyawa sel oksidatif didalam sel dan luar sel. Ketika radikal dimetabolisme didalam sel menghasilkan hidrogen peroksida vitamin C mampu menetralkannya menjadi bentuk dehidroaskorbat. Pada sel ekstraseluler radikal superoksida juga dapat

dinetralsisir vitamin C menjadi monodehisroaskorbat. (Winarsih, 2007; Yowes,2006):

2.3.2 Vitamin E

A) Pengertian dan Karakteristik

Vitamin E senyawa yang dapat mengarah pada tokoferol dan tokotrienol. Masing-masing dapat dilambangkan dengan alpha, beta, gamma, delta dan epsilon. Struktur vitamin E dapat dibedakan berdasarkan tiap cabang metilnya (Sumbono,2017)

Table 2.1 Rantai cabang pada struktur vitamin E (Sumbono,2017)

| TOKOPHEROL | TOKOL | R1 | R2 | R3 |
|--------------|----------------|-----|-----|-----|
| α-tokopherol | 5,7,8-trimetil | CH3 | CH3 | CH3 |
| β-tokopherol | 5,8-dimetil | CH3 | H | CH3 |
| γ-tokpberpol | 7,8-dimetil | H | CH3 | CH3 |
| δ-tokopherol | 8-metil | H | H | CH3 |
| ε-tokopherol | tokol | H | H | H |

Vitamin E dapat bersumber dari minyak jagung, kecambah gandum, sayuran hijau, minyak nabati dll (Winarsih,2007).

B) Mekanisme Kerja Vitamin E

Pemberian suplemen vitamin E dapat melindungi terhadap efek obat, bahan kimia dan logam berat yang menimbulkan radikal bebas. Secara fisik. Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang terdapat di lipoprotein atau di membran lipid. Vitamin E yang larut lemak bersifat nonpolar yaitu tidak bisa larut bersama air oleh karena itu vitamin E dilarutkan dengan pelarut yang memiliki kesamaan sifat non polar seperti minyak (Muliartha,2009).



Sebagai antioksidan, vitamin E berfungsi sebagai donor ion hidrogen yang mampu merubah radikal peroksil (hasil peroksida lipid) menjadi radikal tokoferol yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak. Radikal tokoferol ini juga dapat berubah menjadi non radikal dengan cara dinetralisir oleh bantuan vitamin C dan glutathione (Winarsih, 2007).

2.3.3 Kombinasi Vitamin C dan vitamin E

Vitamin C adalah pertahanan pertama terhadap radikal bebas didalam sel atau plasma dengan cara mendonorkan satu ion hidrogennya. Vitamin C juga dengan mudah dapat menembuh sisi tokoferol. Vitamin E sebagai antioksidan dapat memindahkan atom hidrogennya yang memiliki efek menyingkirkan radikal bebas. Vitamin E yang bereaksi dengan radikal bebas menghasilkan tokoferol yang bersifat radikal. Tokoferol yang bersifat radikal akan menerima ion hidrogen dari vitamin C kemudian menjadi tokoferol yang bersifat stabil (Winarsih, 2007).

Penelitian yang dilakukan Laili pada tahun 2015 kombinasi vitamin C dan vitamin E dengan dosis vitamin C 0,2 mg/grBB, 0,4 mg/grBB, 0,04 mg/grBB dan vitamin E 0,04IU/grBB signifikan menurunkan kadar MDA (melondialdehid) dan meningkatkan kadar SOD (superoksida dismutase) didalam ovarium dengan paparan Rhodamin B 18mg/200gBB.

2.4 Tikus sebagai Hewan Coba



Gambar 2.4 Tikus Putih *Rattus norvegicus* (Akbar,2010)



Klasifikasi tikus putih adalah sebagai berikut (Akbar,2010) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo: Odontoceti

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : *Rattus norvegicus*

2.4.1 Anatomi Ovarium Dan Perkembangan Folikel

Ovarium adalah organ reproduksi yang menghasilkan ovum dan hormon steroid terdapat sepasang di kanan dan kiri (Pearcce,2015).

Perkembangan folikel di ovarium distimulasi oleh hormon FSH (*Follicel Stimulating Hormon*) yang dihasilkan oleh kelenjar pituitary anterior. Pada awal permkembangan ovum dilapisi selaput sel granulosa yang disebut folikel primordial, sel granulosa berfungsi untuk memberikan nutrisi kepada ovum dan menghasilkan hormon estrogen (Guyton,2016).

A) Folikel Primordial dan Folikel Primer

Folikel primordial mengandung oosit primer dengan selapis sel granulosa yang mengelilinginya mempunyai ukuran diameter 25µm terbentuk sejak dalam masa fetus. Diperkirakan pada wanita terdapat 100 ribu folikel primordial yang dapat berkembang jika ada rangsanagn hormon FSH dan LH. Folikel primordial yang sudah mendapat rangsangan dari FSH akan mengalami perkembangan dan pembentukan



ovum menjadi dua kali lebih besar. Kemudian, diikuti dengan pertumbuhan sel-sel granulosa yang makin bertambah disekitar folikel tahapan ini disebut folikel primer. Hormon FSH mempercepat pertumbuhan 6-12 folikel primer tiap bulannya. Folikel primer ditandai dengan terdapatnya selapis atau lebih sel granulosa berbentuk kuboid mengelilingi oosit. (Manuaba,1998; Guyton, 2016)

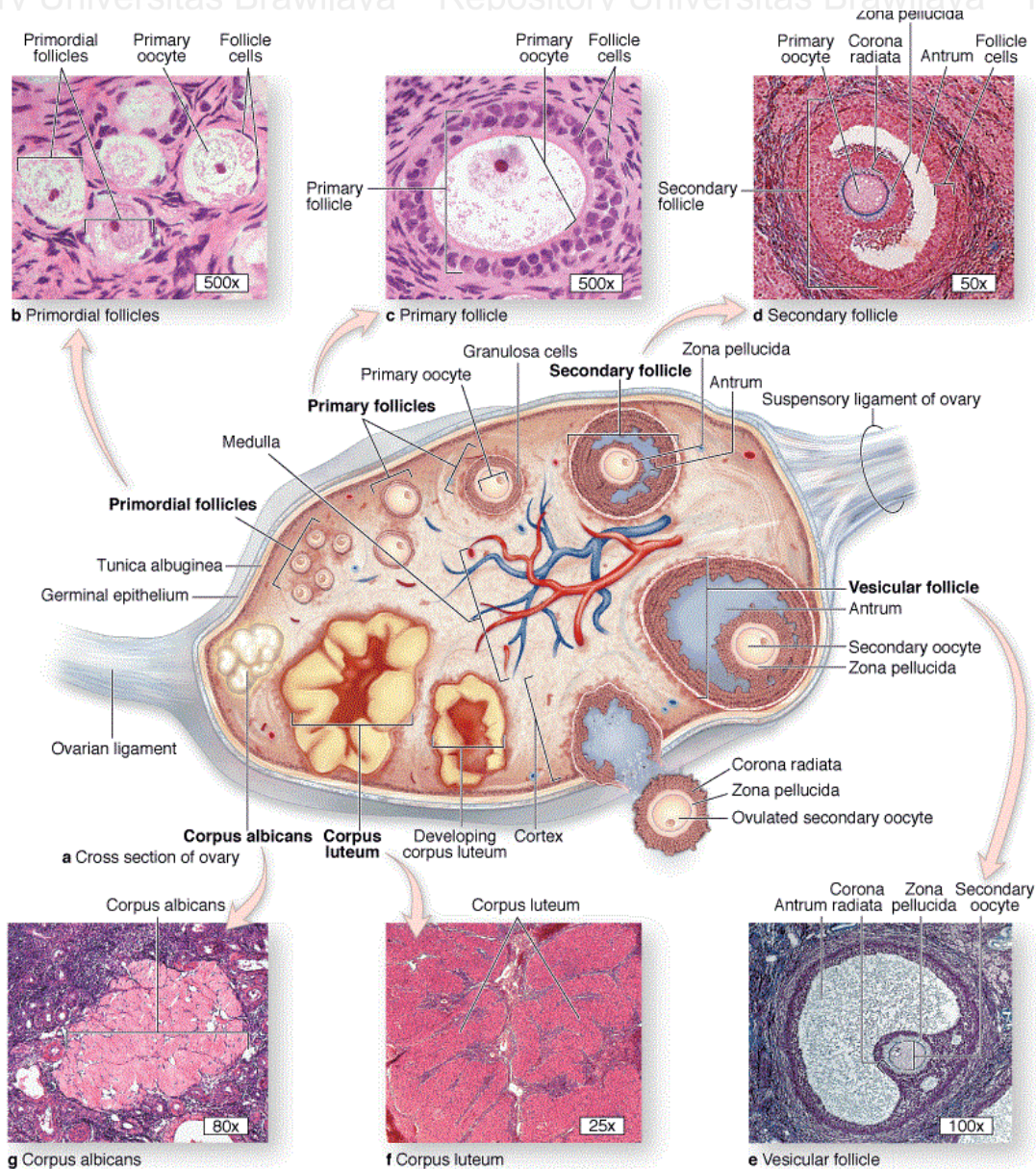
B) Folikel Sekunder

Folikel primer yang terus berkembang menjadi folikel sekunder yang makin membesar diikuti dengan sel granulosa yang terus menebal. Folikel yang semakin membesar pada bagian tepinya dilapisi oleh dua lapisan jaringan ikat yaitu sel teka interna (lapisan dalam yang menghasilkan estrogen) dan sel teka eksternal (lapisan luar). Berkembangnya folikel sekunder juga ditandai dengan terbentuknya cairan antrum disekeliling folikel (Anwar,2005)

C) Folikel De Graff

Folikel didominasi dengan cairan (antrum) disebut folikel matang atau folikel de Graff (Guyton, 20 16). Folikel de Graff terdiri dari (Yulaikhah,2009):

1. Ovum: suatu sel yang besar memiliki diameter sekitar 0,1 mm terdapat nucleus yang jelas
2. Sel granulosa yang berbentuk bulat kecil dengan inti jelas yang mengelilingi folikel ditengahnya terdapat ronggoa berisi cairan folikuli.
3. Sel teka internac: lapisan yang mengelilingi sel granulosa dengan sel yang lebih kecil
4. Sel teka eksterna : sel yang terdapat di luar teka interna.



Gambar 2.5 Perkembangan folikel di ovarium. (a) diagram bagian dari ovarium menampilkan tahapan dari folikel terbentuk hingga maturasi. (b) folikel primordial (c) folikel primer (d) folikel sekunder (e) folikel matang (f) setelah ovulasi dan ovum keluar, folikel menjadi korpus luteum (g) korpus luteum akan berdegenerasi menjadi korpus albicans (Berman *et al*, 2010)

2.4.2 Sistem Reproduksi

Tikus merupakan hewan yang memiliki 4 macam siklus diantaranya diestrus, proestrus, estrus dan metestrus. Siklus estrus terdapat peristiwa ovulasi dimana tikus betina siap untuk dikawinkan, selain dalam siklus estrus biasanya tikus betina menolak untuk dikawinkan dengan tikus jantan. Ovulasi pada tikus secara spontan terjadi pada fase estrus. Pada tikus,



dapat terjadi lebih dari stau folikel yang mengalami ovulasi sehingga memungkinkan kelahiran multiple. Setiap siklus yang terjadi memiliki perubahan-perubahan yang khas hal ini disebabkan adanya perkembangan folikel yang dipengaruhi oleh. Perubahannya ialah pada fase folikuler terdapat fase proestrus dan estrus sedangkan pada fase luteal diestrus dan metestrus (Sumarmin,2016).

A) Proestrus

Proestrus adalah fase dimana sebelum estrus terjadi disaat FSH sedang dalam keadaan tinggi untuk merangsang pembentukan folikel de graff. Pada fase ini estrogen juga dihasilkan dan bertambah banyak. Fase ini terjadi selama 8 jam. Folikel-folikel mengalami pertumbuhan selama 2-3 hari dan akan membesar karena terjadi peningkatan cairan folikular akibat estrogenik. Proestrus dimulai sejak korpus luteum mengalami regresi dan penurunan hormon progesteron. Tikus mengalami peningkatan birahi tetapi belum mau untuk dikawinkan (Akbar,2010; Yekti dkk.,2017)

B) Estrus

Siklus Estrus adalah siklus ovulasi yang ditandai dengan matangnya folikel de graff. Pada fase ini tikus betina siap untuk dikawinkan. Siklus estrus pada tikus berlangsung selama 5 hari. Folikel de graff yang membesar dan matang mengakibatkan adanya kenaikan produksi hormon estrogen. Adanya peningkatan hormon mengakibatkan hormon estrogen membuat sensitivitas LH meningkat sehingga terjadi lonjakan LH dan adanya peristiwa ovulasi (Sumarmin,2016).

C) Diestrus

Diestrus merupakan fase terlama dan terakhir dari siklus estrus. Periode ini terjadi selama 10-13 hari. Diestrus ditandai dengan adanya



produksi FSH yang mulai meningkat sehingga folikel mulai di prosuksi.

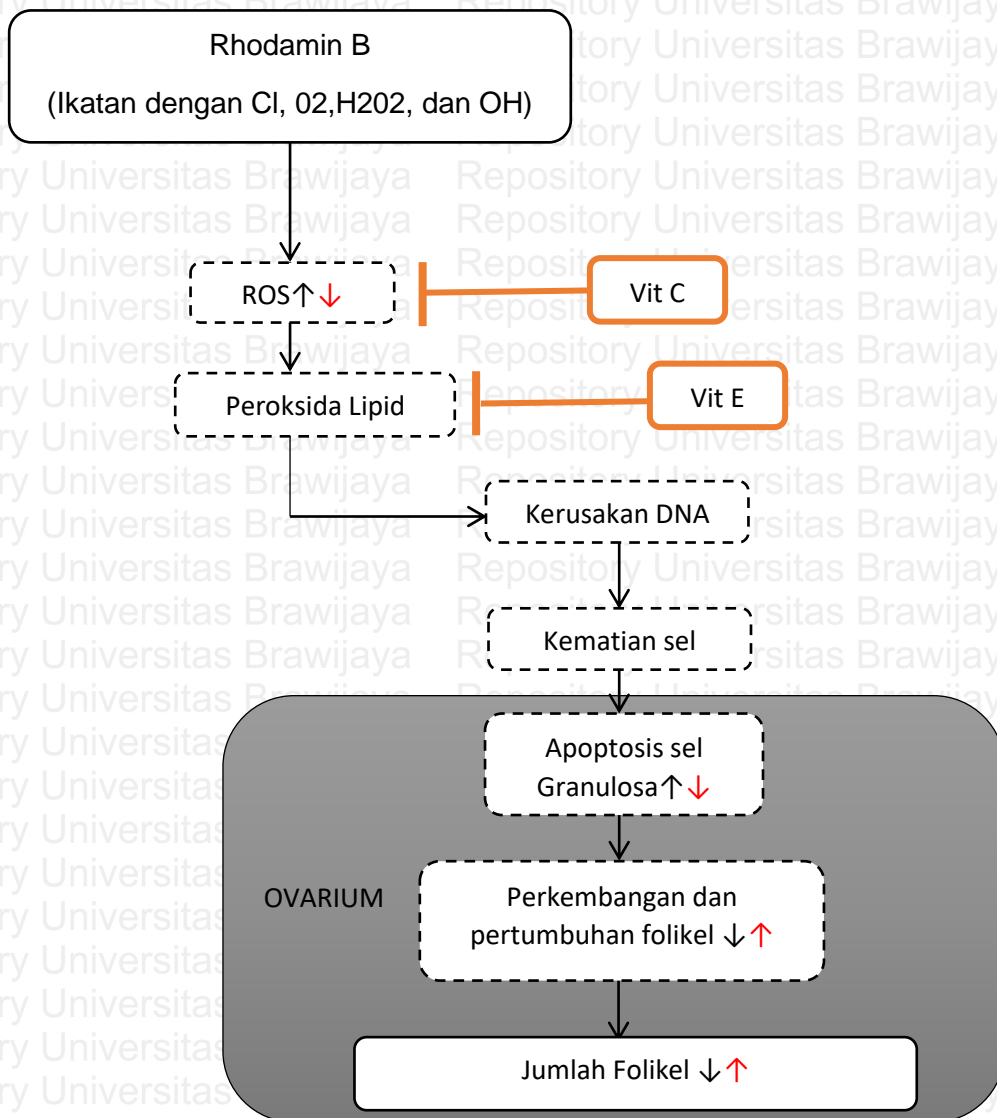
Pada fase ini terlihat perkembangan awal folikel dan tidak ditemukan folikel matang (Sumarmin,2016).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan

- : Diteliti
- : Tidak diteliti
- : Menyebabkan/ mengakibatkan
- ↑↓ : Meningkatkan/ menurun tanpa diberi vitamin C dan E
- ↑↓ : Meningkatkan/menurun dengan diberi vitamin C dan E
- : Menghambat

Rhodamin B dapat menghasilkan radikal bebas turunan oksigen karena memiliki ikatan dengan klorin dan termasuk zat xenobiotik yang dapat menghasilkan radikal bebas turunan oksigen (ROS). ROS jika bereaksi dengan lemak didalam membran sel akan menyebabkan terjadinya peroksida lipid, yang jika dibiarkan akan membuat rantai lipid peroksida menjadi panjang dan semakin meusak membran sel. Radikal bebas yang terus meningkat didalam tubuh dapat menyebabkan keadaan stress oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan. Stress oksidatif membuat kerusakan mutasi DNA. DNA yang mengalami mutasi dapat menyebabkan terganggunya aktifitas sel salah satunya adalah pemicu kematian sel. Stress oksidatif yang terjadi pada ovarium dapat menyebabkan sel graulosa mengalami apoptosis dan menghambat pertumbuhan dan perkembangan folikel. Disamping itu, apoptosis sel granulosa menyebabkan estrogen menurun sehingga pertumbuhan dan perkembangan folikel terganggu sehingga terjadi penurunan jumlah folikel. Kombinasi vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan dapat mencegah terjadinya stress oksidatif didalam tubuh. Antioksidan sebagai gugus pendonor dapat membuat radikal bebas yang bersifat reaktif menjadi stabil sehingga apoptosis sel dapat dicegah dan membuat peningkatan jumlah folikel.

3.2 Hipotesis

Pemberian antioksidan vitamin C, vitamin E dan kombinasi keduanya dapat meningkatkan jumlah folikel pada tikus yang diberi rhodamin B





BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara true eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan pendekatan menggunakan *post test only group design* dengan pengambilan sampel secara *simple random sampling*. Jadi dalam penelitian ini perlakuan atau intervensi yang dilakukan adalah pemberian Rhodamin B dilanjut dengan pemberian vitamin C, vitamin E dan kombinasi vitamin C dan E terhadap hewan coba tikus putih (*Rattus Norvegicus strain wistar*) dengan jenis kelamin betina. Sedangkan fenomena diamati dalam penelitian ini adalah jumlah folikel pada tikus galur wistar betina.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus Norvegicus strain wistar*) yang diperoleh dari laboratorium farmakologi fakultas kedokteran universitas brawijaya malang, dengan kondisi sehat ditandai dengan gerakannya yang aktif.

4.2.1 Besar Sampel

Sampel merupakan bagian populasi yang akan diteliti atau sebagian jumlah dari karakteristik yang dimiliki populasi. Besar sampel dalam penelitian ini disebut replikasi yang merupakan banyaknya tikus yang digunakan dalam setiap kelompok sampel penelitian. Dalam penelitian ini banyaknya replikasi ditentukan dengan menggunakan rumus (Hidayat,2014) sebagai berikut :

Rumus replikasi :

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



Keterangan

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75$$

Berdasarkan rumus di atas maka ditemukan jumlah replikasi adalah 5 dengan dibulatkan bilangan ke atas, untuk menghindari penurunan besar sampel akibat kematian sebesar 20% maka replikasi diperbanyak menjadi

6. Sehingga jumlah keseluruhan sampel menjadi 30 ekor.

4.2.2 Pembagian Kelompok

Tikus yang sesuai dengan kriteria dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol, yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus. Pembagian tikus dilakukan dengan cara acak (simple randomized sampling). Pembagian kelompok tikus tersebut diatas adalah sebagai berikut:

- 1) Kelompok kontrol (-) : kelompok tikus yang tidak diberi Rhodamin B, tidak diberi vitamin C, vitamin E maupun kombinasi vitamin C dan vitamin E, namun diberikan aquabides 1ml dan diberi minyak jagung 1 ml. ekor. Sehingga volume total yang digunakan adalah 2 ml.
- 2) Kelompok kontrol (+) : kelompok tikus yang diberi Rhodamin B dengan dosis 90mg/KgBB, tanpa diberi vitamin C, vitamin E maupun kombinasi vitamin C dan vitamin E, namun diberikan aquabides 1ml dan minyak jagung 1 ml. ekor. Sehingga volume total yang digunakan adalah 2 ml..



- 3) Kelompok perlakuan 1 : kelompok tikus yang diberi rhodmin B dengan dosis 90mg/KgBB + vitamin C 600mg/KgBB/ hari dengan pelarut aquabides 0,5ml dan minyak jagung 1 ml. ekor. Sehingga volume total yang digunakan adalah 2 ml.
- 4) Kelompok perlakuan 2 : kelompok tikus yang diberi rhodmin B dengan dosis 90mg/KgBB + vitamin E dengan dosis 40 IU/KgBB dengan pelarut aquabides 1 ml dan minyak jagung 1 ml. ekor. Sehingga volume total yang digunakan adalah 2 ml.
- 5) Kelompok perlakuan 3 : kelompok tikus yang diberi rhodmin B dengan dosis 90mg/KgBB + kombinasi vitamin C dengan dosis 600mg/KgBB dengan pelarut aquabides 1ml dan vitamin E dengan dosis 40 IU/KgBB dan pelarut minyak jagung 1 ml. ekor. Sehingga volume total yang digunakan adalah 2 ml.

Dosis Rhodamin B yang digunakan mengacu pada hasil penelitian Suciati tahun 2014 tentang Pengaruh paparan Rhodamin B terhadap jumlah folikel Dosis Vitamin C dan Vitamin E mengacu pada penelitian Nur laili tahun 2015 tentang Kombinasi vitamin C dan E menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Indipenden)

Rhodamin B, Vitamin C dan Vitamin E

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Jumlah folikel



4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium farmakologi, laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilakukan sejak sejak 11 desember 2018 sampai 8 februari 2019.

4.5 Kriteria Peneliti

4.5.1 Kriteria Inklusi

- 1) Tikus betina
- 2) Usia 10-12 minggu
- 3) Berat badan 150-250 gram
- 4) Sehat, pergerakan aktif

4.5.2 Kriteria Eksklusi

- 1) Tikus bunting

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

A) Bahan untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Makanan hewan coba adalah makanan ternak dan minuman hewan coba adalah air. Hewan coba dipelihara dalam kandang ukuran 45cmx35,5cmx14,5cm tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5cmx28 cmx 15,5 cm

B) Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

- 1) Rhodamin B serbuk dengan merk Sigma-Aldrich (C.I 45170)
- 2) Vitamin C murni dengan nama dagang C-IPI
- 3) Vitamin E dengan merk Nature-E dalam bentuk kapsul (100IU)
- 4) Minyak jagung
- 5) Aquabides



4.6.2 Alat Penelitian

A) Alat Pemeliharaan Hewan Coba

- 1) Kandang tikus yang berupa box plastic berukuran 45cmx35,5cmx 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5cm x 28cmx15,5cm
- 2) Kandang sebanyak 5 buah diisi sekam sebagai alas dan ditutup dengan kawat berjaring. Masing-masing kandang ditempati 5 tikus
- 3) Tempat minum

B) Alat untuk Pemberian Rhodmain B pada Hewan Coba

- 1) Timbangan analitik
- 2) Botol dengan penutup
- 3) Gelas ukur
- 4) Pengaduk
- 5) Spuit 1 ml
- 6) Spuid yang ujungnya dipasang platina (Sonde)

C) Alat untuk Pemberian Vitamin C pada Hewan Coba

- 1) Botol dengan penutup
- 2) Spuit 1ml
- 3) Spuid yang ujungnya dipasang platina (Sonde)

D) Alat untuk Pemberian Vitamin E Pada Hewan Coba

- 1) Botol dengan penutup
- 2) Gelas ukur
- 3) Pengaduk
- 4) Spuit 1ml
- 5) Spuit yang ujungnya dipasang platina (Sonde)

E) Alat untuk Mengambil Organ Ovarium

- 1) Toples kaca tertutup

- 2) Alat bedah minor (scapel , pinset, gunting, klem, pemegang jaringan)
- 3) Wadah sebagai tempat penyimpanan jaringan sementara sebelum dibuat preparat histopatologi
- 4) Papan untuk meja operasi

F) Alat untuk Pembuatan Slide Histopatologi

- 1) *Tissue Tex Processor*
- 2) Mikrotom
- 3) Waterbath
- 4) Inkubator

G) Alat untuk Pemeriksaan Folikel

- 1) Objek glass
- 2) Cover glass
- 3) Kamera dostlide Olympus XC 10

4.7 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi operasional |
|------------|---|
| Rhodamin B | Pewarna sintetik berwarna Kristal hijau atau serbuk keungunan dengan merek Sigma-Aldrich (C.I 45170) dengan dosis 90mg/KgB diberikan secara peroral menggunakan sonde oleh petugas lab farmakologi FKUB. Dosis Rhodamin B yang digunakan mengacu pada hasil penelitian Suciati tahun 2014 tentang Pengaruh paparan Rhodamin B terhadap jumlah folikel. |
| Vitamin C | Suplemen vitamin C murni dengan merk dagang C-IPI yang diberikana pada tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) betina dengan dosis 600 Mg/Kg BB diberikan secara peroral mealalui sonde oleh petugas lab farmakologi |





FKUB.

Dosis Vitamin C mengacu pada penelitian Nur laili tahun 2015 tentang Kombinasi vitamin C dan E menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium yang dimodifikasi

Vitamin E

Suplemen vitamin E murni dengan merk dagang Natur-E yang diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dengan dosis 40 IU/Kg BB diberikan secara peroral mealalui sonde oleh petugas lab farmakologi FKUB.

Dosis Vitamin E mengacu pada penelitian Nur laili tahun 2015 tentang Kombinasi vitamin C dan E menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium.

Kombinai

vitamin C & vitamin E

Gabungan dari suplemen vitamin C dengan dagang C-IPI dan vitamin E dengan merk dagang Natur-E yang diberikan dengan dosis (Vitamin C 600mg/KgBB/hari+ vitamin E 40IU/KgBB/hari).

Dosis Vitamin C dan Vitamin E mengacu pada penelitian Nur laili tahun 2015 tentang Kombinasi vitamin C dan E menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium yang dimodifikas

Folikel Primer

Folikel fase perkembangan awal yang memiliki deskripsi bagian yaitu terdapat sel granulosa, oosit dan zona pleusida (Victor,2008)

Folikel

Sekunder

Folikel yang memiliki deskripsi bagian yang terdiri sel granulosa, oosit, zona pleusida dan terbentuknya cairan antrum (Victor,2008)



Jumlah Folikel Rata-rata jumlah folikel primer dan folikel sekunder yang diamati dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin dilihat menggunakan camera dotslide dengan 4 lapang pandang dan perbesaran 400x. Perbesaran dan lapang pandang yang diamati mengacu pada penelitian Suciati tahun 2014 tentang Pengaruh paparan Rhodamin B terhadap jumlah folikel

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Cara Kerja

A) Aklimatisasi hewan coba dan pembagian kelompok

Tikus putih diaklimatisasi selama 1 minggu didalam kandang utnuk menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru, dan diberikan pakan standar. Setelah diaklimatisasi, tikus dikelompokan menjadi 5 kelompok. Satu kelompok sebagai kelompok kontrol negatif, satu kelompok positif dan 3 kelompok sebagai kelompok perlakuan.

B) Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Selama perlakuan, tikus ditempatkan pada kandang bak plastic ukuran 45cmx35,5cmx 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5cm x 28cmx15,5cm, botol air dan sekam. Dasar kandang dilapisi dengan sekam padi setebal 0,5-1cm dan diganti setiap 3 hari sekali. Cahaya ruangan dikontrol persis tiap jam 12, jam terang (06.00 sampai denga pukul 18.00) dan 12 jam gelap (pukul 18.00 sampai dengan pukul 06.00) denagn suhu 27-28 derajat, sedangkan temperatur dan kelembapan ruangan dibiarkan berada pada kisaran alamiah. Tikus diadaptasikan dalam kondisi lingkungan penelitian yang baru dengan diberi pakan standar (laboratorium farmakologi fakultas kedokteran



universitas brawijaya) dan minum secara ad libitum. Pakan standar laboratorium farmako fku yaitu berupa pellet. Saat pellet diberi ke tikus dicampurkan dengan air agar konstipasi pellet tidak keras.

C) Penentuan Fase

Mempersiapkan *Cutton buds, cover glass, objek glass, metilen blue* dan mikroskop yang akan digunakan untuk ulas vagina. Masukkan *cutton buds* ke lubang vagina untuk mendapatkan lendir, lalu meletakkan lendir tersebut ke objek glass dan diberi *metilen blue*. Setelah itu tutup dengan *cover glass*. Periksa ulas vagina dengan mikroskop untuk penentuan fase.

D) Prosedur Pemberian Perlakuan pada Hewan Coba

Rhodamin B yang digunakan dalam penelitian ini bermerk Sigma-Aldrich (C.I 45170). Pada dosis Rhodamin B yang diberikan pada setiap tikus sebanyak 90mg/KgBB Serbuk Rhodamin B dilarutkan dengan 1 ml aquabides, diberikan perorale 1 kali dalam sehari, pada pukul 10.00 WIB yang dikerjakan oleh petugas, selama 36 hari.

Vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai nama dagang Cipi dan vitamin E bermerk Natur E, diberikan pada hewan coba per oral 4 jam setelah pemberian Rhodamin B. Menurut penelitian Yulianita dan Effendi tahun (2015) tikus memerlukan waktu 3-4 jam untuk pengosongan lambung dan efektifitas absorpsi pada lambung. Vitamin C dan Vitamin E menggunakan sonde 1 kali sehari dalam 36 hari setiap pukul 14.00 WIB oleh petugas. Waktu Vitamin E dengan merk Nature –E (1 kapsul=100 IU).

E) Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pengambilan organ dilakukan setelah pemaparan selama 36 dan pembedahan dilakukan saat fase diestrus. Peosedur pembedahan sebagai berikut:

- 1) Disiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, kloroform, formalin 10% dan botol-botol tertutup untuk organ tikus
- 2) Tikus diterminasi dengan menginjeksi ketamine 0,2 mg/200gr tikus secara intra muscular dan ditunggu beberapa menit sampai tikus benar-benar tidak bergerak lagi (mati)
- 3) Tikus yang sudah mati diletakkan diatas alas papan dengan perut menghadap ke atas. Tikus ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan paku payung yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki
- 4) Dinding perut dibuka dengan menggunakan pinset dan digunting secara hati-hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah.
- 5) Dengan hati-hati mencari ovarium kanan dan kiri tikus, diambil kemudian dipisahkan
- 6) Hasil yang diperoleh kemudian dikelompokan berdasarkan kelompok perlakuan
- 7) Ovarium sebelah kanan kemudian di fiksasi menggunakan formalin 10% dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk dibuat preperat histologi dan dilakukan pewarnaan HE untuk kemudian dihitung jumlah folikel.
- 8) Bangkai tikus yang sudah tidak digunakan dikubur oleh petugas laboratorium.





F) Prosedur Pembuatan Preparat untuk Pengamatan Folikel

I. Proses pemotongan jaringan berupa makross

- 1) Gross ovarium hasil bedah dimasukkan ke larutan formalin 10% (fiksasi) selama 24 jam.
- 2) Jaringan ovarium dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
- 3) Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter
- 4) Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
- 5) Kaset dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum di proses/ dimasukkan ke alat Tissue Tex Prosesor.
- 6) Diproses menggunakan alat/mesin Tissue Tex Prosesor selama 90 menit
- 7) Alarm bunyi tanda selesai

II. Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan

- 1) Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
- 2) Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan
- 3) Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron
- 4) Hasil pemotongan microtome ditempelkan pada slide kaca

III. Proses Deparafinisasi

Object glass yang telah ditempli jaringan, ditaruh dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80 deraajt, kemudian dimauskkan ke dalam 2 wadah berisi larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke 4 wadah (bak kaca) berisi alcohol masing-maisng tempat 3 menit (hidrasi) dan yang terakhir diletakkan dibawah air mengallir 15 menit

IV. Proses Pewarnaan Hematoxilyn Eosin

- 1) Dicatat utama Harris Hematoksilin selama 10-15 menit
- 2) Diuci dengan air mengalir selama 15 menit
- 3) Alkohol asam 1% 2-5 celup
- 4) Ammonia air 3-5 celup
- 5) Dicat pembeding
- 6) Eosin 1% selama 10-15 menit

V. Dehidrasi

- 1) Direndam alkohol 70% 3 menit
- 2) Direndam alkohol 80% 3 menit
- 3) Direndam alkohol 96 % 3 menit
- 4) Direndam alkohol absolut (99%) 3 menit

VI. Penjernihan (Clearing)

- 1) Direndam Xylol 15 menit
- 2) Direndam Xylol 15 menit

VII. Mounting dengan entelan dan deckglass

- 1) Dibiarkan slide kering pada suhu ruangan
- 2) Diamatin setelah slide kering

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran jumlah folikel ditabulasi sesuai dengan kelompok kemudian dianalisa statistik dengan SPSS dengan langkah sebagai berikut:

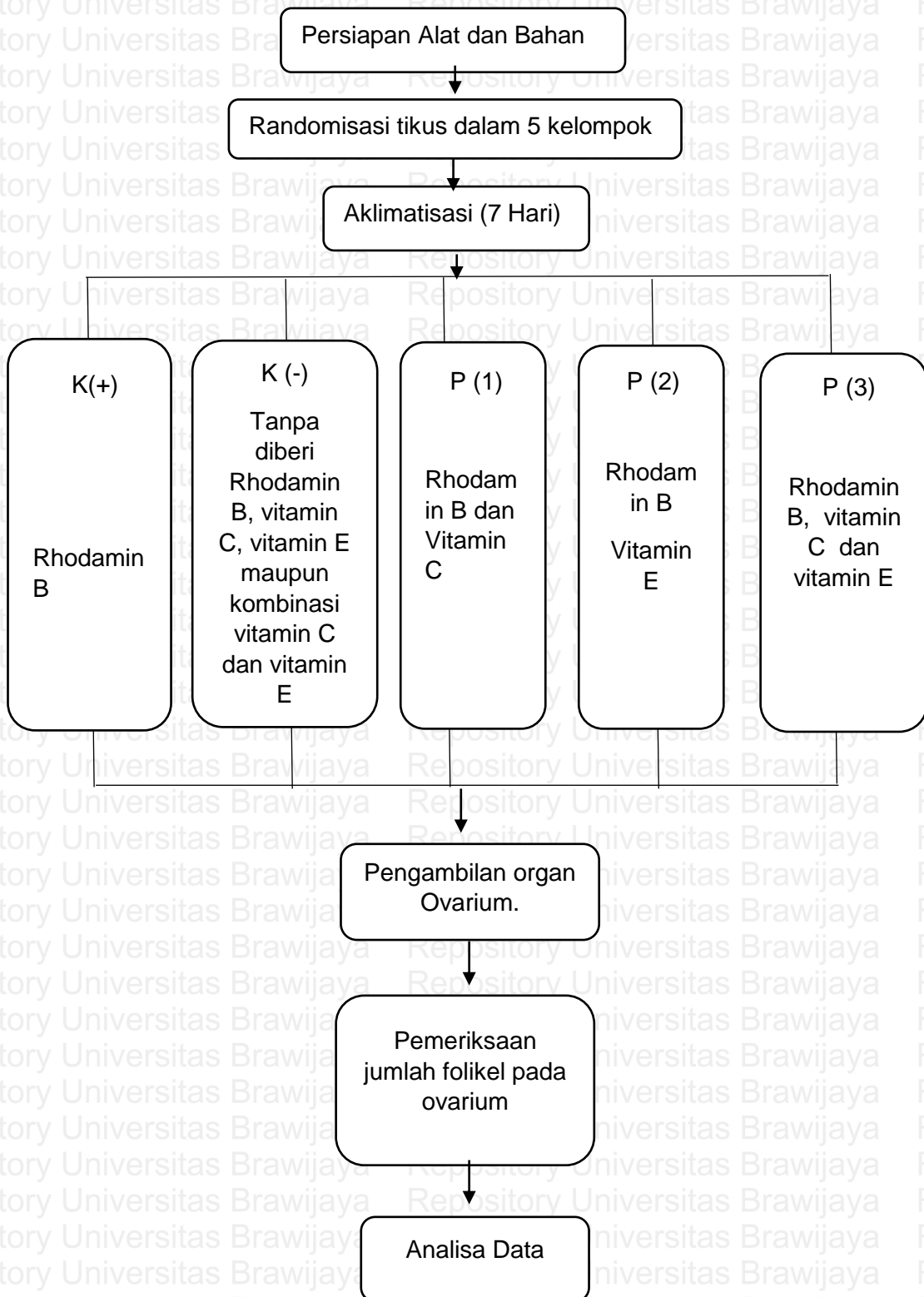
- 1) Uji normalitas data : membuktikan apakah data memiliki distribusi normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung pada normal tidaknya distribusi data. Penelitian ini menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai P -

Value 0,172 Untuk uji hipotesis, karena data terdistribusi normal maka digunakan uji parametrik.

- 2) Uji homogenitas varian : penelitian ini dilkauan uji homogenitas dengan *P-Value* 0,178 yang artinya data bersifat homogen, maka asumsi untuk menggunakan Anova telah terpenuhi.
- 3) Uji one way anova (analisa varian satu arah): membuktikan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui kelompok yang berbeda secara signifikan. Didapatkan *P-Value* 0,551 yang artinya tidka terdapat perbedaan yang signifikan dari kelompok penelitian



4.10 Alur Penelitian





BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Proses dan Hasil Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian true eksperimental yang bertujuan membuktikan pengaruh vitamin C dan vitamin E dan kombinasi keduanya terhadap jumlah folikel tikus galur wista betina yang diberi rhodamin B.

Penelitian ini berlangsung sejak 11 desember 2018 sampai 8 february 2019 yang dilakukan di lab farmakologi universitas brawijaya dengan jumlah sampel sebanyak 25 ekor hewan coba. Pemberian dosis dalam penelitian ini mengacu pada peneliltian Nur laili tahun 2015 tentang Kombinasi vitamin C dan E menurunkan kadar MDA dan meningkatkan SOD pada ovarium yang dimodifikasi. Dosis perlakuan yang diberikan pada hewan coba Rhodamin B 90mg/KgBB, Vitamin C 600mg/KgBB dan Vitamin E 40 IU/KgBB. Hewan coba dibagi dalam lima kelompok perlakuan yaitu:

- 1) K (-) kelompok diberi Minyak wijen dan Aquabides dengan cara personede, tanpa diberi Vitamin C, Vitamin E dan Rhodamin B selama 36 hari sebanyak 5 ekor hewan coba
- 2) K(+) kelompok diberi Minyak wijen, Aquabides , dan Rhodamin B dengan cara personede dan tanpa diberi vitamin c dan vitamin E sebanyak 5 ekor hewan coba
- 3) P1 kelompok diberi Minyak wijen, Aquabides, Rhodamin B dan Vitamin E dengan cara personede dan tanpa diberi Vitamin C sebanyak 5 ekor hewan coba
- 4) P2 kelompok diberi Minyak wijen, Aquabides, Rhodamin B dan Vitamin C dengan cara personede dan tanpa diberi vitamin E sebanyak 5 ekor hewan coba

- 5) P3 kelompok diberi Minyak wijen, Aquabides, Rhodamin B, Vitamin C dan vitamin E dengan ara personele sebanyak 5 ekor hewan coba

Hewan coba yang sudah diberikan perlakuan selama 36 hari akan dilakukan bembedahan dan diambil organ ovarium tikus bagian kanan.

Organ ovarium direndam/dimasukan dalam wadah berisi formalin 10%

untuk selanjutnya dijadikan preparat melalui pewarnaan HE di lab patologi

anatomi universitas brawijaya. Slide organ ovarium selanjutnya dilihat

menggunakan mikroskop Olympus XC 10 dengan pembesaran 400x

untuk diamati melalui empat sudut pandang dan dihitung jumlah folikel

masing-masing kelompok perlakuan. Analisis data pada penelitian ini

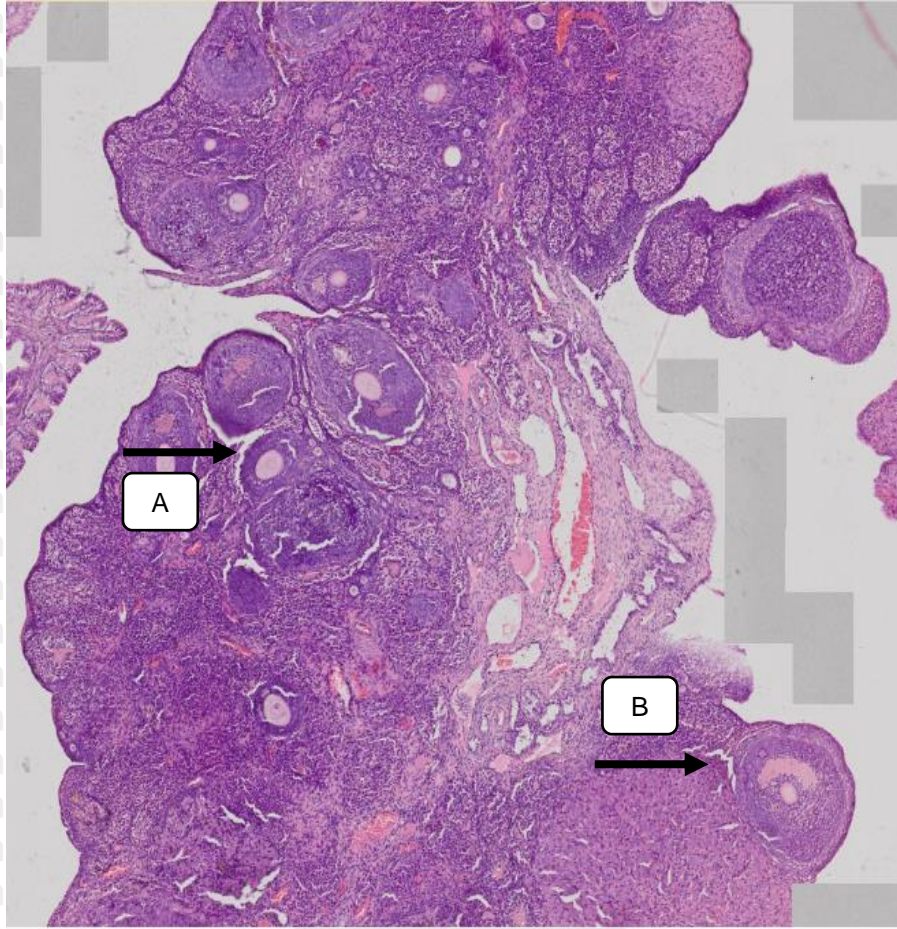
menggunakan uji normalitas dan homogenitas uji anova dan post hoc

didapatkan bahwa terdapat perbedaan jumlah rata-rata folikel primer tiap

perlakuan tetapi tidak ada



5.2 Gambaran Perkembangan Folikel



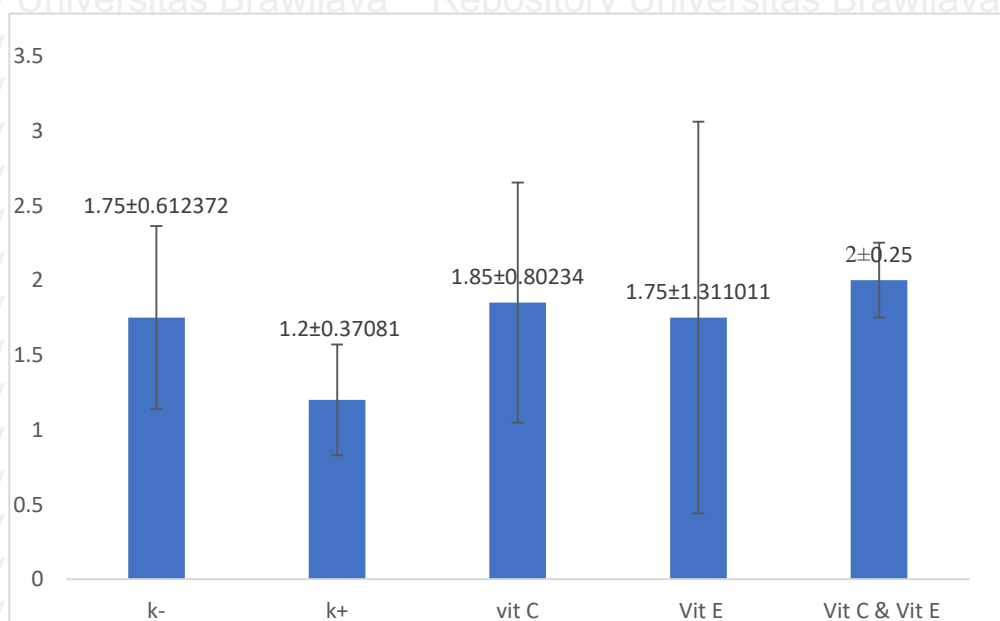
Gambar 5.1 Gambaran histologi folikel tikus menggunakan perwarnaan hematoxylen Eosin dan diamati menggunakan kamera dotslide Olympus XC 10. Keterangan : (A) Folikel Primer; (B) Folikel Sekunder

Berdasarkan gambar 5.1 penelitian ini dilakukan homogenitas pada fase Diestrus yaitu terdapat folikel primer dan folikel skunder tetapi tidak ditemukannya folikel dgraff. Hal ini, sesuai dengan ciri fase diestrus yaitu proses awal pembentukan folikel dan hanya folikel primer dan sekunder yang ditemukan.

5.3 Hasil Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-wilk untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal.

Analisis yang dipakai pada Shapiro-wilk jika Sig $>0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal namun jika Sig $<0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi tidak normal. Shapiro-wilk didapatkan data pada table *Test Of Normality* bahwa nilai Sig atau *P Value* 0,178 yang dinyatakan data tersebut terdistribusi normal karena nilai P-Value melebihi 0,05. Berdasarkan uji normalitas yang didapatkan maka penelitian ini dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan uji homogenitas. Berdasarkan uji homogenitas yang dilakukan pada software SPSS didapatkan nilai Sig atau *P Value* 0,172 maka disimpulkan bahwa varian masing-masing kelompok tersebut adalah sama atau homogen maka asumsi untuk menggunakan uji anova terpenuhi. Nilai Sig pada uji anova didapatkan *P-Value* 0,551 yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan dari kelompok penelitian.



Gambar 5.3 Histogram Rerata Jumlah Folikel Pada Masing-Masing Kelompok Pengamatan

Berdasarkan gambar 5.1 terlihat tren rerata jumlah folikel dimulai dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif, pemberian vitamin C, vitamin E dan kombinasi vitamin C dan vitamin E. Gambaran histogram diatas dapat dilihat kecenderungan penurunan rata-rata jumlah folikel yang terendah terdapat pada kelompok kontrol positif. Jadi, jika dibandingkan kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dapat kita simpulkan pemberian rhodamin B terbukti menurunkan jumlah folikel tikus galur wistar betina (*Rattus Novergicus*). Sedangkan, terdapat peningkatan jumlah folikel tikus perlakuan kontrol positif jika dibandingkan dengan pemberian perlakuan Vit C, Vit E maupun kombinasi keduanya. Hal ini membuktikan bahwa pemberian antioksidan vitamin C, vitamin E maupun kombinasi keduanya memiliki efek meningkatkan jumlah folikel tikus galur wistar betina yang dipapar rhodamin B. Tetapi secara statistic memiliki nilai yang tidak signifikan atau bersifat sama.





BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Perbedaan Jumlah Folikel Perlakuan diiberikan Rhodamin B dengan Tidak diiberikan Rhodamin B

Uji statistik rerata jumlah folikel pada penelitian ini diketahui bahwa data terdistribusi normal dan bersifat homogen dilihat berdasarkan uji normalitas dan homogenitas yang sudah dilakukan, selanjutnya data memenuhi persyaratan untuk uji anova menggunakan *software* SPSS dengan kesimpulan terdapat perbedaan jumlah antara masing-masing kelompok perlakuan tetapi secara stasistika tidak ada perbedaan yang signifikan atau dengan kata lain bersifat sama.

Ovarium merupakan organ reproduksi pada wanita yang berperan menghasilkan ovum atau sel telur. Sel telur didalam ovarium melalui berbagai tahapan perkembangan untuk sampai pada tahap folikel dgraff atau folikel matur yang siap ovulasi dan dibuahi oleh sperma. Perkembangan folikel didalam ovarium dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor internal seperti regulasi hormon dan dapat pula dipengaruhi faktor dari eksternal seperti asupan nutrisi, paparan kimia. Jumlah folikel pada wanita normal umumnya saat bayi menghasilkan 2 juta sel telur menjelang dewasa jumlahnya berkurang hingga 300.000 butir saja, jumlah ini akan terus mengalami penurunan hingga menopause(Guython,2016).

Rhodamin B adalah zat pewarna sintetik yang saat ini masih ditemukan sebagai pewarna makanan terutama jajanan di pinggir jalan (Sobinoff,2012).

Rhodamin B menurut Aryani tahun 2015 dapat berinteraksi dengan metabolisme sel menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2), Superoksida (O_2^{\cdot}) dan radikal hidroksil (HO^{\cdot}). Radikal bebas yang dihasilkan dapat



menyebabkan keadaan stres oksidatif yang dapat merusak membran sel normal di sekitarnya dan merusak komposisi DNA sehingga menyebabkan terjadinya suatu mutasi DNA. Stress oksidatif pada ovarium dapat mengaktifasi p53 untuk menginisiasi terjadinya apoptosis sel granulosa dan mempengaruhi penurunan jumlah folikel dan menyebabkan infertilitas (Gillham et al,2012).

Pada penelitian ini pengamatan kelompok kontrol positif ($1.2000 \pm 0,370$) memiliki rerata folikel yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol negatif ($1.75000 \pm 0,6123$). Hal ini membuktikan bahwa radikal bebas yang disebabkan oleh rhodamin B mampu menurunkan jumlah folikel pada tikus betina galur wistar (*Rattus Norvegicus*) selama paparan rhodmain B 36 hari. Namun, pada penelitian ini didapatkan bahwa terdapat penurunan rerata jumlah folikel tetapi tidak memiliki nilai yang signifikan secara statistic. Hal ini diduga saat stress oksidatif menyebabkan kerusakan pada DNA, aktivasi p53 masih mampu *merepair* atau memperbaiki kerusakan tersebut sehingga apoptosis dapat dicegah. Menurut penelitian Dewi tahun 2014 jika terdapat kerusakan DNA, maka DNA repair gene-lah yang akan diinduksi terlebih dahulu. Jika perbaikan gagal, DNA yang mengalami kerusakan akan diinduksi ke mesin apoptosis melalui aktivasi gen Bax. Ekspresi Bax yang diinduksi oleh p53 dapat mempercepat proses apoptosis.

6.2 Perbedaan Pemberian Rhodamin B dengan Tikus yang Diberi Vitamin C, Vitamin E dan Kombinasinya

Antioksidan disebut juga sebagai senyawa pendonor elektron yang mampu menghambat dan mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan didapat baik dari dalam tubuh maupun dari luar tubuh melalui makanan atau suplemen tambahan (Murray,2012). Berdasarkan gambar 5.2



terdapat peningkatan rerata jumlah folikel tikus pemberian vitamin C ($1.8500 \pm 0,80$) jika dibandingkan dengan kontrol positif ($1.200 \pm 0,370$).

Vitamin C merupakan salah satu senyawa antioksidan larut air yang bekerja pada plasma sel. Vitamin C bekerja dengan cara mendonorkan elektron hidrogen kepada senyawa radikal bebas di dalam sitosol maupun ekstraseluler. Vitamin C berinteraksi secara langsung dengan senyawa radikal mengubahnya menjadi stabil sehingga kerusakan dapat dicegah (Winarsih, 2007). Selain vitamin C terdapat antioksidan lain yang mampu menghambat kerusakan radikal bebas yaitu vitamin E. berdasarkan gambar 5.3 terdapat peningkatan jumlah folikel antara kelompok tikus pemberian vitamin E ($1.7500 \pm 1,311$) dibandingkan kelompok kontrol ($1.200 \pm 0,370$). Vitamin E dapat melindungi dari efek obat dan paparan bahan kimia yang berpotensi menghasilkan radikal bebas pada membran sel. Vitamin E sebagai antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan ion hidrogennya dan merusak rantai lipid peroksida yang diakibatkan oleh reaksi radikal bebas dan lipid sehingga kerusakan pada membran sel dapat dicegah. Vitamin E selanjutnya akan berubah menjadi radikal tokoferol yang dapat dinetralisir oleh *Glutation* antioksidan dalam tubuh atau dapat bereaksi dengan vitamin C agar menjadi senyawa tokoferol yang stabil (Winarsih, 2007).

Terdapat peningkatan rerata jumlah folikel pada pemberian kombinasi vitamin C dan vitamin E ($2.000 \pm 0,75$) dibandingkan dengan kontrol positif ($1.200 \pm 0,370$). Vitamin C dan vitamin E secara mampu berkerja sama untuk melawan radikal bebas didalam tubuh. Vitamin C selain bekerja sebagai antioksidan didalam plasma sel juga dapat menetralsir radikal tokoferol menjadi stabil. Vitamin E mampu mendonorkan elektronnya untuk menetralsir radikal bebas didalam membran sel dan berubah menjadi tokoferol yang



bersifat radikal. Radikal tokoferol selanjutnya mampu dinetralkan oleh vitamin C dan berubah menjadi stabil (Winarsih,2007).

Menurut rerata jumlah folikel pada kelompok perlakuan vitamin C, Vitamin E maupun kombinasi keduanya terdapat peningkatan jumlah folikel jika dibandingkan dengan kontrol positif tetapi memiliki nilai yang tidak signifikan secara statistik. Hal ini diduga aktifitas antioksidan pada kelompok perlakuan sudah mampu mencegah penurunan folikel tetapi hasil yang diharapkan tetapi, belum mencapai efek maksimal sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Disamping itu, jika memacu pada penelitian sebelumnya Laili tahun 2015 tentang rhodamin B dan pemberian suplemen vitamin. Suplemen Vitamin yang digunakan merupakan vitamin murni sehingga diduga memiliki efek yang lebih kuat.

Selanjutnya, pada kelompok perlakuan juga dapat dilihat bahwa jumlah folikel vitamin C lebih tinggi jika dibandingkan dengan pemberian vitamin E. Hal ini diduga ketika radikal bebas terakumulasi didalam tubuh vitamin C sebagai pertahanan pertama pada plasma sel langsung dapat menetralkan radikal bebas sehingga kerusakan yang lebih parah dapat dicegah (Simanjuntak,2012). Sedangkan, ketika radikal bebas didalam plasma terus meningkat dan bereaksi dengan lipid pada membran sel barulah vitamin E bekerja memutus rantai lipid peroksida tersebut. Jumlah folikel vitamin E yang lebih rendah dibandingkan vitamin C diduga vitamin E belum mampu meredakan peroksida lipid didalam membran sel sehingga proses kerusakan sel tetap berlangsung. (Winarsih,2007). Hal ini didukung oleh penelitian Mahdi *et al* pada tahun 2018 bahwa vitamin C lebih efektif untuk menurunkan apoptosis sel dibandingkan dengan pemberian vitamin E. Penelitian lain yang mendukung yaitu Sitorus *et al* tahun 2017 pemberian vitamin C lebih efektif menurunkan kadar MDA dibandingkan dengan vitamin E.



Pada penelitian ini jumlah rerata folikel normal mengacu pada kontrol negatif.

Perbandingan kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol negatif, menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan yang artinya pemberian vitamin C, vitamin E dan kombinasi keduanya mampu meningkatkan jumlah folikel kembali pada kondisi normal.

Rerata folikel kelompok perlakuan kombinasi vitamin C dan vitamin E jika dibandingkan dengan kelompok negatif memiliki perbedaan jumlah folikel yang cukup tinggi dengan kondisi normal meskipun tidak memiliki hasil yang signifikan. Hal ini dapat disebabkan penggunaan suplemen antioksidan secara terus-menerus atau dengan dosis tinggi dapat mengubah fungsi antioksidan menjadi prooksidan. Pemberian suplemen vitamin C dan vitamin E ketika digunakan secara terus-menerus dapat menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat menginduksi terbentuknya radikal bebas hidroksil. Peningkatan radikal bebas dapat mengaktifkan Nf-KB yang menekan apoptosis dan merangsang proliferasi sel (Mastrangelo et al, 2017). Berdasarkan dugaan di atas bahwa pemberian kombinasi vitamin C dan E dapat menjadi penyebab berkurangnya apoptosis sel dan meningkatnya proliferasi sehingga, jumlah folikel pada pemberian kombinasi lebih tinggi dibandingkan normal. Tetapi, secara statistika tidak signifikan atau bersifat sama.

6.3 Keterbatasan Peneliti

Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu homogenitas pada siklus estrus ada baiknya dilakukan pada fase proestrus dimana perkembangan folikel pada tahap maksimal serta perhitungan jumlah folikel seharusnya dilakukan oleh seseorang yang ahli dalam bidangnya sehingga didapatkan hasil yang lebih akurat.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Pemberian Rhodamin B tidak memiliki pengaruh terhadap jumlah folikel pada tikus galur wistar betina.

7.1.2 Pemberian vitamin C, Vitamin E dan kombinasinya tidak memiliki pengaruh terhadap jumlah folikel pada tikus galur wistar betina yang diberi rhodamin B.

7.2 Saran

Beberapa saran yang dapat diberikan peneliti :

7.2.1 Diharapkan penelitian selanjutnya dapat meneliti variable lain yang mempengaruhi kualitas folikel seperti jumlah sel granulosa dan diameter folikel.

7.2.2 Diharapkan penelitian selanjutnya dapat menemukan variasi dosis yang tepat.



DAFTAR PUSTAKA

- Asadi E., Ronak Shabani., Soraya G., Mohammad J . 2013. *Preventing Effect Of Vitamin E On Oocytes Apoptosis In Morphine-Treated Mice. International Journal Morphol.*, 31(2):533-538, 2013.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa yang Berpotensi sebagai Bahan Antiinfertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- Anwar, S & Ayesha A. 2016. *Infertility: A Review On Causes, Treatment And Management. Volume 2. Issue 6*. Women's Health & Gynecology.
- Anwar, R. 2005. *Skripsi Morfologi dan Fungsi Ovarium*. Subbagian Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Unpad Bandung.
- Ayuni, Ni Putu & Putu Lilik P . 2015. *Pengaruh Ph dan Waktu Kontak Pada Adsorpsi Rhodamin B menggunakan Membran Polielektrolit (Pec) Kitosan-Pektin* Seminar Nasional.
- Ahmad et Al., 2017. *Protein Oxidation: An Overview Of Metabolism Of Sulphur Containing Amino Acid, Cysteine*. [Frontiers In Bioscience, Scholar, 9, 71-87.]
- Agarwal Dkk., 2012. *The Effects Of Oxidative Stress On Female Reproduction: A Review*. 10:49 Online (Http:// [www.Rbej.Com/Content.101/49](http://www.rbej.com/content.101/49). Di Akses (5 Mei 2018).
- Alsa, A. 2004. *Pendekatan Kuantitatif kualitatif dalam penelitian psikologi*, Yogyakarta. Pustaka Belajar
- Aryani, Novita. 2015. *Efek Paparan Rhodamin B Terhadap Perubahan Makroskopis Dan Histologi Mukosa Kolon Mencit Jantan*. Jurusan Keperawatan. Akademi Keperawatan Pemkab Lamkab
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan. 2011. *Laporan Tahunan Badan Pengawas Obat Dan Makanan*. Jakarta: Badan POM.
- Berman B, Eckel CM, Lewis R, Mc Kinley M, Widmaier E. Dalam: Mescher AL, penyunting. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas*. Edisi ke-12 Asia: The McGraw-Hill Companies; 2010. Chapter 22.
- Campbell Dkk., 2000. *Biologi Edisi 5*. Jilid 3. Alhi Bahasa. Erlangga. Jakarta.



Cahyadi Wisnu. 2012. *Analissi Dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan Bagian 2*. Jakarta Bumi Aksara.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia . *Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 Tentang Kesehatan*. Jakarta.

Diao, J.Z. Zhang, T. Zhao, F. Xue, F. Gao, S.M. Ma, Y. Wang. 2016. Vitamin E promotes breast cancer cell proliferation by reducing ROS production and p53 expression. 2016; 20: 2710-2717. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*.China

Dewi, Pramesti & Wayan Winarti. 2014. Peran Mutasi Gen p53 pada Karsinogenesis Sel Basal Kulit. Volume 45 No 1. Departemen Anatomi Patologi Universitas Udayana: Bali.

Febrina R., Ngurah I,W., Ni Wayan S., 2013. Pengaruh Pemberian Rhodamin B Terhadap Siklus Estrus Mencit (Mus Musculus L) Betina. *Jurnal Biologi. Vol XVI. No 1. 1 Juni 2013*

Gillham C M., Jhon R., Donal H. 2017. *Predicting the Response of Localised Oesophageal cancer to Neo-adjuvant chemoradiation*. *World journal of surgical oncology*. 5:97.

Guyton & Hall. 2016. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran edisi 12*. Singapura : Elsevier.

Hermiyanti, Pertiwi 2016. Pengaruh Paparan Klorin Di Udara Terhadap Peroksidasi Lipid Pada Pekerja Kolam Renang. Vol7. N02. *Jurnal Penelitian Kesehatan" Suara Forikes"(Journal Of Health Research" Forikes Voice"*)

Haendeler, et al. 1996. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. 19;317(2-3):407-11. *United state National library of medicine*. Elsevier

Hidayat, Alimul A. 2014. *Metode Penelitian Kebidanan dan teknik Analisa Data*. Jakarta; Salemba Medika.

Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2010. *Buku Pedoman Lapangan Antar Lembaga Kesehatan Reproduksi Dalam Situasi Darurat Bencana*. Jakarta.

Kim J-H, S. Yoon, M. Par., J-J Ko, K Lee and J Bae. 2011. *Differential Apoptotic Activities Of Wild-Type Foxl2 And The Adult-Type Granulosa*



Cell Tumor-Associated Mutant Foxl2 (C134w). *Oncogene* 2011. 30, 1653–1663.

Laili Nur A., Intin A., I Wayan A.W., I wayan A.I., Wisnu B., Yuyun Y. 2015. *Protective Effect Of Combined Vitamin C And E Against Ovarian And Endometrial Toxicity In Rats That Receiving Oral Rhodmin B*. *Biomarkers Ang Genomic Medicine* (2015) 7, 154-158.

Nani, D. 2018. *Fisiologi Manusia Siklus Reproduksi Wanita*. Jakarta : Penebar Swadaya Grup.

Purwita, L. 2016. *Pengaruh Pemberian Kombinasi Vitamin C Dan Vitamin E Sebagai Tindakan Preventif Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Yang Dipapar Boraks*. Vol. 9, No. 3, November.

Paulina, Yamlean. 2011. *Identifikasi Dan Penetapan Kadar Rhodamin B Pada Jajanan Kue Berwarna Merah Muda Yang Beredar Di Kota Manado*. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 11 No. 2, Oktober 2011.

Pearce, E C. 2015. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta Gramedia Pusaka Utama.

Parwata, Made. 2016. *Buku Ajar Antioksidan*. Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar Bali

Praja, D. 2015. *Zat Adiktif Makanan Manfaat Dan Bahayanya*. Penerbit Garudhawaca. Yogyakarta

Restu T dan Bambang S. S. 2017. *Analisis Zat Pewarna Rhodamin-B Pada Jajanan Yang Dipasarkan Di Lingkungan Sekolah*. Universitas Dr. Soetomo Surabaya

Roosdiana Dkk. 2017. *Pengaruh Rhodamin B Dan Sakarin Terhadap Aktivitas Superoxide Dismutase (Sod) Ginjal Tikus Putih (Rattus Novergicus)*. Fakultas Matematika Dan Ipa Universitas Negeri Yogyakarta.

Suprihatin, T. 2008. *Korelasi antara Oosit Domba yang Dikoleksi dari Rumah Pemotongan Hewan dengan Tingkat Fertilitasnya setelah Fertilisasi in vitro*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* Volume XVI, Nomor 2. Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP

Sulistina Et Al., 2014. *Rhodamin B Increases Hypothalamic Cell Apoptosis And Distrupts Hormonal Balance In Rats*. (2014) 180-183. *Asian Pacific Journal Of Reproduction* . Elsevier



Sunarya & Setyabudi. 2007. *Mudah dan Aktif Belajar Kimia*. Bandung: PT setia purnama inves.

Safitri A Y., I Wayan Agung Indrawan., Sri Winarsih 2015. *Rhodamine B Induces Oxidative Stress And Cervical Epithelial Cell Proliferation In The Uterus*. *Toxicology Reports* 2 (2015) 1434–1436.

Sobinoff A P, Ilana R. Bernstein., Eileen A. Mclaughlin. 2012. *All Your Eggs In One Basket: Mechanisms Of Xenobiotik Induced Female Reproductive Senescence*. Priority Research Centre In Chemical Biology, University Of Newcastle Australia.

Syamsyul, hadi. 2011. *Mekanisme Apoptosis pada Regresi Sel Luteal*. Vol 3 no 2. Majalah kesehatan pharmamedika.

Setiyono A., Hendy H., , Budi P., Margarita M. 2015. *Pengaruh Tingkat Stres dan Kadar Kortisol dengan Jumlah Folikel Dominan pada Penderita Infertilitas yang Menjalani Fertilisasi Invitro*. *Majalah Obstetri & Ginekologi*, Vol. 23 No. 3 September - Desember 2015 : 128-132

Suciati, S. 2014. *Pengaruh Paparan Rhodamin B terhadap Jumlah Folikel Ovarium dan Kadar Malondialdehyde (MDA) Ovarium pada Tikus Rattus Novegicus*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang

Sumbono, A. 2016. *Biokimia Pangan Dasar*. Yogyakarta: Deepublish.

Sumarmin, R. 2016. *Perekembangan Hewan*. Jakarta : Kencana.

Simanjuntak, Kristina. 2012. Mekanisme radikal bebas terhadap induksi karsinogenesis. Volume 23. No 5. Edisi agustus 2012, 356-263. Fakultas kedokteran UPN: Jakarta

Manuaba, Ida Bagus. 1998. *Imu Kebidanan, Penyakit Kandungan & Keluarga Berencana Untuk Pendidikan Bidan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC

Mastrangelo Domenico, Lauretta Massai, Giuseppe Fioritoni and Francesco Lo Coco. 2017. Chapter 4 Vitamin C Against Cancer. <https://www.intechopen.com/books/vitamin-c/vitamin-c-against-cancer>

Mehranjani S. M & Mansori T. 2016. *Stereological On The Effect Of Vitamin C In Preventing The Adverse Effect Of Bisphenol A On Rat Ovary*. Vol 14. No 16. Pp: 403-410. International Journal Of Reproductive Biomedicine.



Murray, R. K., Davud, A.Bender., & Kathlee, M.Botham. 2012. *Biokimia harper* (29 ed.). Jakarta: Buku Kedokteran EGC;

Gillham. Williams, C.J., & G.F. Erickson.2012. Morphology and Physiology of the Ovary. <http://www.endotext.org/female/female1/female1.htm> [17 september 2018].

Muliarta, Endang S , Yuliawati. 2009. Oral Consumption of Combine Vitamin C E Repair Liver Damage Due to Subchronic Exposure to Cigarette. *Jurnal Kedoktera Brawijaya*, Vol. XXV, No. 1, April 2009.

Winarsih, Hery. 2007. Antioksidan alami dan radikal bebas. Yogyakarta:kansius. Wetipo Yafeth S., Jubhar Ch, Mangimbulude., Ferdy S. Rondonuwu. 2013. Produksi ROS Akibat Akumulasi Ion Logam Berat dan Mekanisme Penangkal Dengan Antioksidan. Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga

Victor, Eroschenko. 2008. *Atlas Of Histologi*. University of Idaho: Wolters kluwer

Yowes,Agus tri. 2006. Sifat prooksidan dan antioksidan vitamin C dan the hijau pada sel khamir berdasarkan peroksidasi lipid. Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam. Bogor

Yekti A P., Trinil S., Moh. Nur I., Sri W. 2017. *Fisiologi Reproduksi Ternak : Dasar Manajemen Reproduksi*. Malang: Universitas Brawijaya Press.

Yulaikhah, I. 2009. *Seri Asuhan Kebidanan Kehamilan*. Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC.

Yulianita, M E. 2015. *Penelitian Uji Efektivitas Jangka Panjang Kombinasi Ekstrak Buah Cabe Jawa dan Biji Mahoni sebagai Penambah Stamina padi Tikus Putih Jantan* Vol. 3, No. 2: 64-69, Juli 2015. Program Studi Farmasi.

**LAMPIRAN****1. PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Elsa Amelya

NIM : 155070600111007

Program Studi : Program Studi Sarjana Kebidanan

Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya tersebut

Malang, 21 Mei 2019

Yang membuat pernyataan





1. PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Elsa Amelya

NIM : 155070600111007

Program Studi : Program Studi Sarjana Kebidanan

Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya tersebut

Malang, 21 Mei 2019

Yang membuat pernyataan

Elsa Amelya



2. HASIL ANALISIS DATA

Uji Normalitas

Tests of Normality

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Jumlah Folikel | .150 | 25 | .150 | .943 | 25 | .178 |

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | K Neg | 5 | | |
| K Pos | 5 | 1.2000 | .37081 | .16583 | .7396 | 1.6604 | .75 | 1.75 |
| P1 | 5 | 1.8500 | .80234 | .35882 | .8538 | 2.8462 | 1.25 | 3.25 |
| P2 | 5 | 1.7500 | 1.31101 | .58630 | .1222 | 3.3778 | .25 | 3.75 |
| P3 | 5 | 2.0000 | .25000 | .11180 | 1.6896 | 2.3104 | 1.75 | 2.25 |
| Total | 25 | 1.7100 | .75236 | .15047 | 1.3994 | 2.0206 | .25 | 3.75 |

Test of Homogeneity of Variances

| Jumlah Folikel | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1.784 | 4 | 20 | .172 |

ANOVA

| Jumlah Folikel | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1.835 | 4 | .459 | .781 | .551 |
| Within Groups | 11.750 | 20 | .588 | | |
| Total | 13.585 | 24 | | | |



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Folikel

Tukey HSD

| (I) Kelompok | (J) Kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| K Neg | K Pos | .5500 | .48477 | .787 | -.9006 | 2.0006 |
| | P1 | -.1000 | .48477 | 1.000 | -1.5506 | 1.3506 |
| | P2 | .0000 | .48477 | 1.000 | -1.4506 | 1.4506 |
| | P3 | -.2500 | .48477 | .985 | -1.7006 | 1.2006 |
| K Pos | K Neg | -.5500 | .48477 | .787 | -2.0006 | .9006 |
| | P1 | -.6500 | .48477 | .670 | -2.1006 | .8006 |
| | P2 | -.5500 | .48477 | .787 | -2.0006 | .9006 |
| | P3 | -.8000 | .48477 | .485 | -2.2506 | .6506 |
| P1 | K Neg | .1000 | .48477 | 1.000 | -1.3506 | 1.5506 |
| | K Pos | .6500 | .48477 | .670 | -.8006 | 2.1006 |
| | P2 | .1000 | .48477 | 1.000 | -1.3506 | 1.5506 |
| | P3 | -.1500 | .48477 | .998 | -1.6006 | 1.3006 |
| P2 | K Neg | .0000 | .48477 | 1.000 | -1.4506 | 1.4506 |
| | K Pos | .5500 | .48477 | .787 | -.9006 | 2.0006 |
| | P1 | -.1000 | .48477 | 1.000 | -1.5506 | 1.3506 |
| | P3 | -.2500 | .48477 | .985 | -1.7006 | 1.2006 |
| P3 | K Neg | .2500 | .48477 | .985 | -1.2006 | 1.7006 |
| | K Pos | .8000 | .48477 | .485 | -.6506 | 2.2506 |
| | P1 | .1500 | .48477 | .998 | -1.3006 | 1.6006 |
| | P2 | .2500 | .48477 | .985 | -1.2006 | 1.7006 |



Homogeneous Subsets

Jumlah Folikel

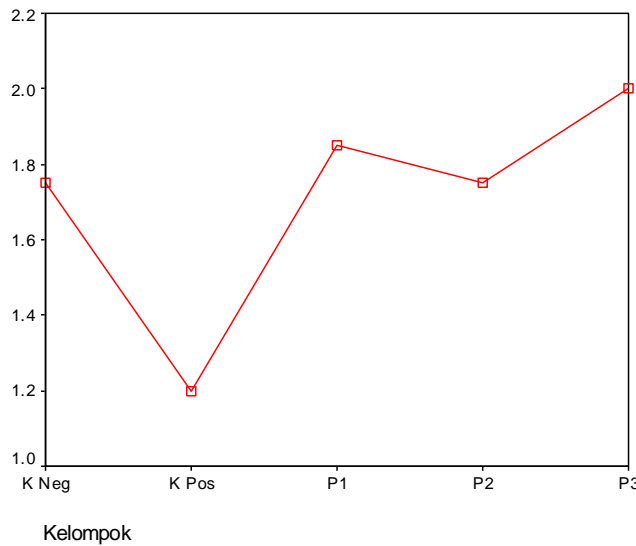
Tukey HSD^a

| Kelompok | N | Subset for alpha = .05 |
|----------|---|------------------------------|
| | | 1 |
| K Pos | 5 | 1.2000 |
| K Neg | 5 | 1.7500 |
| P2 | 5 | 1.7500 |
| P1 | 5 | 1.8500 |
| P3 | 5 | 2.0000 |
| Sig. | | .485 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Means Plots





3. SURAT KETERANGAN KELAIKAN ETIK



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

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

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

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

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

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

PENELITI : Maulida Diah Setiawati
Elsa Amelya
Rizky Kurniasari

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

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua,



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

Catatan :

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



4. DOKUMENTASI



Proses Aklimitasi



Tikus yang diberi pakan & diganti sekamnya



Penimbangan berat badan tikus



Swab vagina pada tikus



Pembuatan Rhodamin B



Rhodamin B



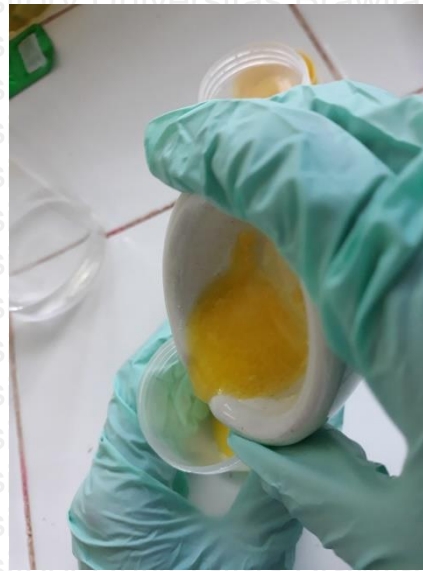
Pemberian Rhodamin B pada tikus



Pemberian Vitamin E



Pembuatan vitamin E



Pembuatan Vitamin C



Pemberian Vitamin C



Vitamin E dan Vitamin C

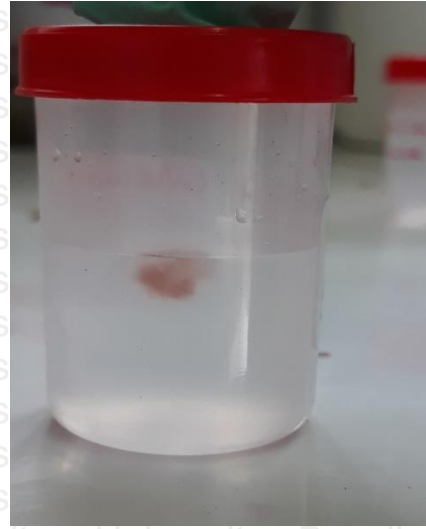


Proses pembedahan





Pengambilan organ ovarium bagian kanan



Ovarium direndam formalin 10%



Proses pembuatan sediaan histopatologi