

**PENGARUH GnRH ANTAGONIS TERHADAP
EKSPRESI RESEPTOR ESTROGEN (ER_s) DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI UTERUS
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Oleh:

ANUGRAH NATALIA PUTRI TALENTA

155130100111035



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH GnRH ANTAGONIS TERHADAP EKSPRESI
RESEPTOR ESTROGEN (ERs) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI UTERUS TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ANUGRAH NATALIA PUTRI TALENTA
155130100111035



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen
(ERs) dan Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*)****Oleh:****ANUGRAH NATALIA PUTRI TALENTA****NIM. 155130100111035**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 13 Juni 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

NIP. 19650616 199111 1 001

drh. Herlina Pratiwi, M.Si

NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anugrah Natalia Putri Talenta

NIM : 155130100111035

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen (ERs) dan Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 13 Juni 2019

Yang menyatakan,

(Anugrah Natalia Putri Talenta)

NIM.155130100111035

**Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen
(ERs) dan Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih
(*Rattus norvegicus*)**

ABSTRAK

Peternakan di Indonesia didominasi oleh usaha peternakan berskala kecil. Upaya peningkatan produktivitas ternak perlu dilakukan untuk mengembangkan peternakan yakni dengan memperhatikan aspek reproduksi. Manajemen pemeliharaan sapi yang tidak baik dapat menyebabkan gangguan reproduksi. Hipofungsi ovarium merupakan salah satu gangguan reproduksi yang sering dijumpai. Hipofungsi ovarium merupakan suatu kondisi dimana folikel gagal mengovulasikan ovum. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan hewan model hipofungsi yang diinduksi GnRH antagonis yakni *Cetrorelix acetate* dan mengamati ekspresi reseptor estrogen (ERs) dan perubahan gambaran histopatologi uterus. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok penelitian yang terdiri dari 6 ekor tikus putih galur *Wistar* betina, berusia 8-9 minggu, dan berat badan sekitar 150-200 gram. Kelompok perlakuan dibagi menjadi kontrol negatif (tanpa injeksi *Cetrorelix acetate*), kelompok perlakuan P1 (injeksi *Cetrorelix acetate* 0,009 mg/ekor), dan kelompok perlakuan P2 (injeksi *Cetrorelix acetate* 0,0135 mg/ekor). Gambaran histopatologi uterus diamati dengan mengukur perubahan ketebalan endometrium dan ekspresi reseptor estrogen diamati dengan metode imunohistokimia. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dianalisa dengan ANOVA dengan probabilitas 5% yang kemudian dilanjutkan dengan Uji BNJ. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan P1 dan P2 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan ekspresi reseptor estrogen tertinggi (ER α sebesar 45 % dan ER β sebesar 75,7%) dan penurunan ketebalan endometrium (42,8%) terjadi pada kelompok P2. Kesimpulan dari penelitian ini adalah GnRH antagonis dapat menurunkan ekspresi reseptor estrogen dan menyebabkan endometrium lebih tipis.

Kata Kunci: *GnRH antagonis, Cetrorelix acetate, Hipofungsi Ovarium, Reseptor Estrogen, Uterus, Tebal Endometrium*

**The Effect of GnRH Antagonists on the Expression of Estrogen Receptors
(ERs) and Uterus Histopathological Features of White Rat
(*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Indonesian livestock is dominated by small-scale livestock businesses. Increasing the livestock productivity can be done by paying attention to the reproductive aspects. A bad management can lead to reproductive disorders. Ovarian hypofunction is one of the most common reproductive disorders. Ovarian hypofunction is a condition where the follicle fails to ovulate the ovum. The purpose of this study is to develop an animal model of ovarian hypofunction induced by GnRH antagonists such as *Cetrorelix acetate* and to observe the expression of estrogen receptors (ERs) and uterus histopathology features. This study used three groups of treatments consisted of 6 *Wistar* white rats of 8-9 weeks in age, and weighed around 150-200 grams. The three groups were divided into negative control (with no injections of *Cetrorelix acetate*), group P1 (injected by *Cetrorelix acetate* 0,009 mg/rat), and group P2 (injected by *Cetrorelix acetate* 0,0135/rat). Uterine histopathology features were evaluated by calculating the changes in endometrial thickness and the expression of estrogen receptors were analyzed with immunohistochemistry. The data obtained in this study was analyzed with ANOVA with a probability of 5%, followed by HSD Test. The results of the study showed a significant difference in group 1 (P1) and group 2 (P2) compared to the negative control group. The highest reduction in estrogen receptor (ER α by 45% and ER β by 75.7%) and endometrial thickness (by 42.8%) occurred in group P2. The conclusion of this study is GnRH antagonists was proven to reduce the expression of estrogen receptors and endometrial thickness.

Keywords: *GnRH antagonist, Cetrorelix acetate, Ovarian hypofunction, Estrogen Receptor, Uterine, Endometrial thickness*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan kasih-Nya penulis dapat menyusun skripsi dengan judul “Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen (ERs) dan Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)” sebagai tugas akhir/skripsi sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan. Penelitian ini merupakan payung penelitian dari drh. Aulia Firmawati, M.Vet , drh. Herlina Pratiwi, M.Si dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Drs. Agung Pramana W. M., M.Si dan drh. Herlina Pratiwi, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan dengan kesabarannya memberikan motivasi, arahan dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini.
2. drh. Aulia Firmawati, M.Vet dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. drh. Ani Setianingrum, M.Sc dan Ibu Agri Kaltaria Anisa, S.Farm, Apt selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan semangat dan saran yang membangun.
4. Dr.Ir.Sudarminto Setyo Yuwono,M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dan seluruh jajaran dekanat, dosen dan staf yang telah membantu dan memfasilitasi untuk terlaksananya tugas akhir ini.

5. Keluarga tercinta papa Yusuf Wibisono, mama Nina Mariyati, kakak Yoga Kristian Wibisono dan saudara kembar Anugrah Natalia Puput Talenta yang selalu memberi dorongan, dukungan dan doa yang tiada henti untuk penulis
6. Teman seperjuangan SERSAN Mitra Artha Kurnia Hutabarat dan Diana Rahmayani Putri atas segala dukungan, doa dan semangat suka duka bersama selama penelitian berjalan.
7. Teman-teman DNA terkhusus CLASSY CLASS atas dukungan, inspirasi dan waktunya. Saudara terkasih PMK Veteriner, teman-teman Asisten Embriologi Veteriner dan Higiene Makanan atas segala dukungan doa, semangat, bantuan moril yang sangat membangun.

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dan berharap skripsi ini dapat bermanfaat baik bagi penulis dan maupun bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 GnRH Antagonis.....	6
2.2 Tikus Putih.....	8
2.2.1 Siklus Estrus.....	9
2.2.2 Sistem Reproduksi Tikus Betina.....	12
2.2.2.1 Uterus.....	12
2.3 Hormon Reproduksi Betina.....	14
2.4 Reseptor Estrogen.....	17
BAB 3 KERANGKA KONSEP	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Bagan Kerangka Konseptual.....	21
3.3 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.2 Alat dan Bahan.....	23
4.3 Sampel Penelitian	24
4.4 Rancangan Penelitian.....	24
4.5 Variabel Penelitian	25
4.6 Tahapan Penelitian.....	25

4.7	Prosedur Kerja.....	25
4.7.1	Persiapan Hewan Coba	25
4.7.2	Swab Vagina.....	26
4.7.3	Injeksi <i>Cetrorelix acetate</i>	26
4.7.4	Euthanasia dan Pengambilan Uterus.....	27
4.7.5	Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Uterus.....	28
4.7.6	Pengamatan Ekspresi Reseptor Estrogen pada Uterus dengan IHK.....	30
4.7.7	Analisis Data.....	32
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	33
5.1	Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen (ERs) Uterus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	33
5.2	Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	43
BAB 6	PENUTUP.....	49
6.1	Kesimpulan	49
6.2	Saran	49
	DAFTAR PUSTAKA.....	50
	LAMPIRAN.....	55



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	25
5.1 Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi ER α	36
5.2 Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi ER β	38
5.3 Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Tebal Endometrium.	45
6.1 Tes Normalitas Ekspresi ER α	63
6.2 Tes Homogenitas Ekspresi ER α	63
6.3 Tabel Deskriptif Ekspresi ER α	63
6.4 Uji ANOVA Ekspresi ER α	63
6.5 Uji BNJ Ekspresi ER α	64
7.1 Tes Normalitas Ekspresi ER β	65
7.2 Tes Homogenitas Ekspresi ER β	65
7.3 Tabel Deskriptif Ekspresi ER β	65
7.4 Uji ANOVA Ekspresi ER β	65
7.5 Uji BNJ Ekspresi ER β	66
8.1 Tes Normalitas Tebal Endometrium.....	67
8.2 Tes Homogenitas Tebal Endometrium.....	67
8.3 Tabel Deskriptif Tebal Endometrium.....	67
8.4 Uji ANOVA Tebal Endometrium.....	67
8.5 Uji BNJ Tebal Endometrium.....	68
8.6 Uji Korelasi ER α , ER β dan Tebal Endometrium	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur GnRH.....	7
2.2 Ikatan Kimia <i>Cetrorelix acetate</i>	7
2.3 Tikus Putih.....	8
2.4 Fase Proestrus.....	10
2.5 Fase Estrus	10
2.6 Fase Metestrus.....	11
2.7 Fase Diestrus.....	11
2.8 Histologi Uterus.....	13
2.9 Struktur ER α dan ER β	18
2.10 Mekanisme Aksi Estrogen.....	19
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
4.1 Reproduksi Tikus Betina.....	27
4.2 Skema Pengukuran Tebal Endometrium.....	30
5.1 Ekspresi ER α Uterus (40x).....	34
5.2 Ekspresi ER α Uterus (100x).....	35
5.3 Ekspresi ER β Uterus (40x).....	37
5.4 Ekspresi ER β Uterus (100x).....	38
5.5 Hasil Pengukuran Tebal Endometrium.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Laik Etik.....	56
2 Kerangka Operasional.....	57
3 Perhitungan Dosis Konversi dari Dosis Manusia ke Tikus.....	58
4 Tahapan Alur Pembuatan Preparat Histopatologi Uterus dengan Pewarnaan HE.....	59
5 Tahapan Alur Pembuatan Preparat Imunohistokimia.....	61
6 Hasil Statistika Ekspresi ER α	63
7 Hasil Statistika Ekspresi ER β	65
8 Hasil Statistika Tebal Endometrium.....	67
9 Dokumentasi Penelitian.....	69

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
°	Derajat
µm	Mikrometer
µL	Mikroliter
mg	Miligram
CL	Corpus Luteum
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
ERs	Reseptor Estrogen
FSH	<i>Folicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	<i>Gonadotropin releasing Hormone</i>
HE	<i>Hematoxillin-Eosin</i>
IHK	Imunohistokimia
K-	Kontrol Negatif
kg	Kilogram
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
mL	Mililiter
P1	Kelompok Perlakuan 1
P2	Kelompok Perlakuan 2
P4	Progesteron
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGF2α	Prostaglandin
RAL	Rancangan Acak Lengkap
GnRH-a	<i>Gonadotropin releasing Hormone</i> Antagonis
LH-RH	<i>Luteinizing Hormone releasing Hormone</i>
EREs	<i>Estrogen Responsive Elements</i>
SC	Subkutan

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penduduk di Indonesia khususnya di daerah pedesaan sebagian besar menginvestasikan hartanya untuk beternak sapi. Peternakan sapi milik warga biasanya dikelola dengan 2 cara yakni secara individu dan kelompok. Pemeliharaan secara individu dilakukan di belakang rumah berbeda dengan pemeliharaan secara kelompok / bersama - sama yang ditempatkan maupun dikelola dalam kandang bersama. Peternakan warga banyak dikelola dengan cara tradisional dimana pemeliharaan ternak hanya berdasarkan pengalaman sehingga sulit untuk berkembang (Widyaningrum, 2014).

Menurut LPPM (2015) pola pemeliharaan ternak di Indonesia akan tetap didominasi oleh usaha peternakan berskala kecil yakni peternakan warga. Beternak sapi perlu memperhatikan beberapa aspek yang mana bila terpenuhi, maka peternakan sapi milik warga akan mampu berkembang. Aspek - aspek yang harus terpenuhi untuk meningkatkan produktivitas diantaranya adalah aspek bibit, aspek pakan, aspek reproduksi dan aspek perkandangan (Prihandini *et al.*, 2005). Menurut Hermadi (2015) manajemen pemeliharaan sapi yang tidak baik dapat menyebabkan gangguan reproduksi.

Gangguan reproduksi ditandai dengan rendahnya fertilitas induk yang akan berakibat pada menurunnya angka kebuntingan dan jumlah kelahiran pedet. Penelitian yang dilakukan oleh Sutiyono *et al.* (2017) menyatakan bahwa

persentase kasus gangguan reproduksi pada peternakan rakyat meliputi ovarium sistik, endometritis, uterus yang tidak normal, ovarium yang tidak aktif dan paling mendominasi adalah kejadian hipofungsi ovarium. Hipofungsi ovarium adalah keadaan dimana ovarium mengalami penurunan fungsinya sehingga tidak terjadi perkembangan folikel maupun ovulasi. Hewan yang mengalami hipofungsi ovarium biasanya mengalami siklus ovulasi yang tertunda atau ovulasi lebih lama dibandingkan siklus normalnya (McKinnon *et al.*, 2011).

Mekanisme regulasi hormon yang tidak normal dapat menyebabkan terjadinya hipofungsi ovarium yang biasanya ditandai dengan adanya sel - sel folikel yang gagal dalam menanggapi rangsangan hormonal, perubahan kuantitas maupun kualitas sekresi hormonal, terjadi penurunan rangsangan yang berkaitan erat dengan fungsi hipotalamus - pituitaria ovarium yang akan menyebabkan menurunnya sekresi GnRH sehingga tidak ada aktivitas ovarium (Hafez dan Hafez, 2000).

Ovulasi pada ternak tersebut bisa jadi tertunda karena gangguan hormon FSH dan LH sehingga tidak terdapat folikel yang cukup matang untuk diovulasikan. FSH merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel hingga menjadi folikel de Graaf yang akan mensekresikan hormon estrogen dalam jumlah yang cukup banyak untuk menimbulkan gejala estrus. Hormon LH bersama dengan FSH merangsang pematangan folikel dan menyebabkan terjadinya ovulasi. Pada saat folikel matang dan kadar estrogen tinggi maka LH akan mencapai puncaknya untuk memicu pematangan sel telur dan pemecahan dinding

folikel yang disebut dengan ovulasi. Hormon estrogen disekresikan oleh sel theca dan sel granulosa pada ovarium sebagai respon terhadap FSH dan LH. Estrogen akan mengalami peningkatan jumlah dibawah pengaruh hormon gonadotropin. Rangsangan hormon gonadotropin yang meningkat ini akan membuat ovarium, uterus, vagina dan tuba fallopi bertambah besar. Estrogen dapat memberikan efek pada organ dan jaringan target apabila pada organ dan jaringan tersebut memiliki reseptor estrogen. Reseptor estrogen merupakan kelompok protein yang diaktifkan oleh hormon estrogen dan ditemukan di dalam sel. Penemuan reseptor estrogen dapat digunakan sebagai prediksi dan penanda prognostik adanya gangguan reproduksi pada hewan (Desfariza, 2016).

Gangguan reproduksi pada hewan seperti hipofungsi ovarium dapat terjadi karena terganggunya mekanisme regulasi hormon oleh penekanan sintesa hormon reproduksi. Salah satu obat pada manusia yang digunakan untuk menekan produksi ovum adalah *Cetrorelix acetate*. Obat ini telah digunakan masyarakat untuk kontrol stimulasi ovarium, bekerja dengan menekan lonjakan *Luteinizing Hormone* (LH) yang terlalu dini. Penekanan LH terjadi karena menurunnya jumlah reseptor GnRH pada sel-sel gonadotropin. Pemberian *Cetrorelix acetate* mampu menyebabkan terjadinya penurunan fungsi ovarium dengan menghambat ovulasi karena terganggunya mekanisme hormon reproduksi (Beckers *et al.*, 1997).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh GnRH antagonis yakni *Cetrorelix acetate* ditinjau dari

ekspresi reseptor estrogen (ERs) dan gambaran histopatologi uterus tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hasil penelitian ini nantinya dapat digunakan untuk penelitian lanjutan hipofungsi ovarium dalam menentukan terapi dan penanganan hipofungsi ovarium yang tepat bagi tikus model hipofungsi ovarium yang kemudian hari dapat diterapkan pada kasus gangguan reproduksi peternakan di Indonesia.

1.2 Rumusan Permasalahan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana ekspresi reseptor estrogen uterus pada tikus putih dengan induksi GnRH antagonis?
2. Bagaimana gambaran histopatologi uterus pada tikus putih dengan induksi GnRH antagonis?

1.3 Batasan Masalah Penelitian

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus betina galur *Wistar* dengan berat sekitar 150-200 gr usia 8-9 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Penggunaan hewan coba akan meminta persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.
3. Perlakuan yang diberikan yakni pemberian *Cetrorelix acetate* dengan dosis 0,009 mg/ekor dan 0,0135 mg/ekor diberikan satu kali dalam sehari dengan pemberian melalui subkutan area abdominal selama 15 hari.

4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi reseptor estrogen pada uterus menggunakan metode imunohistokimia dan gambaran histopatologi uterus dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekspresi reseptor estrogen uterus pada tikus putih dengan induksi GnRH antagonis.
2. Mengetahui gambaran histopatologi uterus pada tikus putih dengan induksi GnRH antagonis.

1.5 Manfaat Penelitian

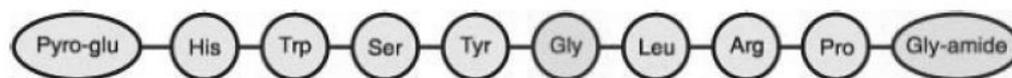
Diharapkan penelitian ini bermanfaat dalam menyediakan informasi berupa ekspresi reseptor estrogen dan gambaran histopatologi uterus tikus putih hasil induksi GnRH Antagonis yakni *Cetrorelix acetate*. Hasil penelitian yang diperoleh nantinya dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai pengembangan hewan model hipofungsi ovarium. Dari penelitian lanjutan tersebut diharapkan dapat bermanfaat dalam menentukan terapi dan penanganan hipofungsi ovarium yang tepat bagi tikus model hipofungsi ovarium yang kemudian hari dapat diterapkan pada kasus gangguan reproduksi peternakan di Indonesia.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 GnRH Antagonis

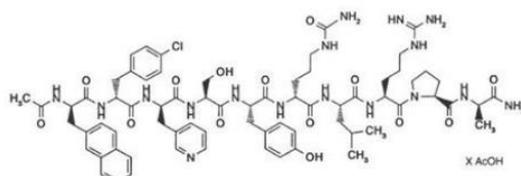
GnRH antagonis (GnRH-a) adalah inhibitor kompetitif dari GnRH dalam mengikat reseptornya. Pemberian secara subkutan menghasilkan penurunan LH dan FSH. Efek penurunan ini terjadi signifikan setelah diberikan beberapa suntikan GnRH antagonis. Sejak tahun 1972, GnRH antagonis mulai dikembangkan dan diproduksi, namun pada saat itu terdapat efek samping pada penggunaannya. Efek samping tersebut berkaitan dengan kemampuan mereka untuk melepaskan histamin pada kulit tempat suntikan pemberian GnRH antagonis. Generasi baru GnRH-a tanpa sifat pelepasan histamin yang signifikan sekarang tersedia untuk penggunaan klinis termasuk dalamnya adalah *Cetrorelix acetate* (Bouchard dan Fauser, 2000).

Cetrorelix acetate termasuk dalam *Gonadotropin-Releasing Hormone* antagonis (GnRH-a). GnRH antagonis adalah golongan medikasi yang fungsinya berlawanan dengan GnRH. GnRH antagonis menghasilkan hambatan kompetitif pada reseptor GnRH dan segera menghentikan pelepasan gonadotropin dan fungsi GnRH. Dibandingkan dengan GnRH agonis, onset aksi GnRH antagonis secara signifikan lebih cepat dan memiliki waktu paruh yang panjang serta afinitas tinggi untuk mengikat reseptor GnRH tetapi tanpa mengaktifkannya (Bouchard dan Fauser, 2000).



Gambar 2.1 Struktur GnRH (Olive dan Palter, 2007).

Cetrorelix acetate memiliki beberapa struktur kimia yang mirip dengan GnRH dalam tubuh dengan substitusi pada beberapa asam aminonya. *Cetrorelix acetate* memiliki rumus molekul Asetil-D-3- (2'-naphtyl) – alanine – D – 4 – chlorophenylalanine-D-3-(3'-pyridyl)-alanine - L - serin - L - tyrosine - D - citruline - L - leucine - L - arginine - L - proline - D - alanine amide. *Cetrorelix acetate* umumnya digunakan oleh masyarakat untuk mengontrol stimulasi ovarium pada program IVF. *Cetrorelix acetate* terbukti efektif, aman dan memiliki toleransi yang tinggi untuk pencegahan ovulasi prematur pada wanita yang sedang menjalani kontrol stimulasi ovarium. *Cetrorelix acetate* diberikan secara subkutan dan dapat digunakan menurut kebutuhan besar dosisnya yakni dosis ganda setiap hari sebanyak 0,25 mg dan dosis tunggal 3 mg (Beckers *et al.*, 1997). Bioavailabilitas *Cetrorelix acetate* setelah injeksi SC sekitar 85% dan memiliki paruh eliminasi terminal setelah diberikan secara subkutan sekitar 30 jam (Coccia *et al.*, 2004).



(Ac-D-Nal₁-D-Cpa₂-D-Pal₃-Ser₄-Tyr₅-D-Cit₆-Leu₇-Arg₈-Pro₉-D-Ala₁₀-NH₂)

Gambar 2.2 Ikatan kimia *Cetrorelix acetate* (Beckers *et al.*, 1997)

Cetrorelix acetate dan GnRH bersaing dalam tubuh untuk mengikat reseptor membran pada sel pituitari yang menyebabkan sekresi LH dan FSH terpengaruh. Efek *Cetrorelix acetate* pada produksi LH dan FSH bersifat *reversible* setelah pemberian dihentikan (Rodney, 2013).

2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina

Tikus putih merupakan satu diantara banyak hewan yang sering digunakan sebagai hewan percobaan. Kelebihan dari tikus putih sebagai hewan percobaan antara lain bersifat omnivora (pemakan segala) serta mempunyai jaringan yang hampir sama dengan manusia. Tikus memiliki ukuran organ yang lebih besar daripada mencit sehingga lebih mudah untuk diamati (Kusumawati, 2004).



Gambar 2.3 Tikus Putih (Jondriatno, 2012).

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub - filum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Sub - kelas	: Theria
Ordo	: Rodensia

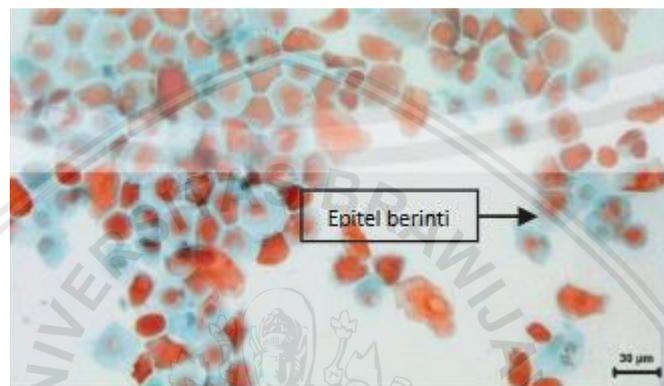
- Sub - ordo : Sciuromorphi
Famili : Muridae
Sub Famili : Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus merupakan hewan berkaki 4 yang memiliki panjang sekitar 40 cm diukur dari ujung hidung sampai ekor. Berat tikus putih betina dapat mencapai sampai 300 gr per ekornya. Terdapat tiga galur atau varietas tikus yang sering digunakan sebagai hewan percobaan yakni galur *Sprague - Dawley* yang memiliki ciri berkepala kecil, berwarna albino putih dan ekornya lebih panjang dari badannya. Galur *Wistar* yang memiliki ciri kepala besar dan ekor yang lebih pendek. Galur *Long Evans* yang lebih kecil dari tikus putih dan memiliki warna hitam pada kepala dan tubuh bagian depan (Malole dan Pramono, 1989).

2.2.1 Siklus Estrus

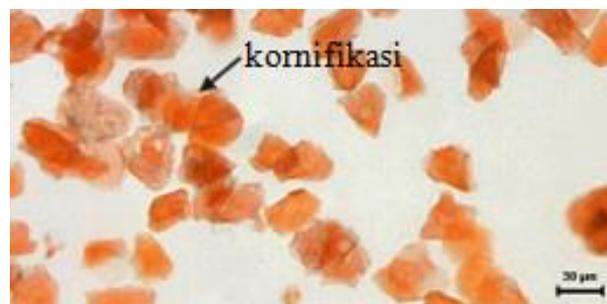
Siklus reproduksi tikus mencakup durasi satu periode siklus yang disebut siklus estrus dan dapat dilihat melalui gambaran mikroskopis pengamatan apusan vagina. Siklus estrus pada tikus dibagi menjadi empat yakni proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Fase folikuler dimulai dengan proestrus yang diikuti oleh estrus dan ovulasi; fase luteal terdiri atas metestrus yang diikuti oleh diestrus (Macmillan dan Burke, 1996).

Proestrus merupakan fase yang terjadi menjelang estrus, dicirikan dengan mulai munculnya gejala birahi pada hewan betina tetapi belum mau menerima pejantan untuk kawin. Fase proestrus dapat diketahui dengan adanya dominasi sel-sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau bertumpuk pada pengamatan ulas vagina. Pada tikus fase ini berlangsung selama kira-kira 12 jam



Gambar 2.4 Fase Proestrus (Paccola, 2013).

Fase proestrus akan dilanjutkan ke fase estrus yang ditandai dengan keinginan betina untuk menerima pejantan dan kawin. Fase estrus dapat diketahui dengan adanya sel tanduk (sel-sel kornifikasi) yang banyak pada lumen vagina yang terlihat pada preparat ulas vagina dan fase ini berlangsung selama 12 jam. Ovulasi terjadi pada akhir estrus dalam waktu yang sangat singkat.



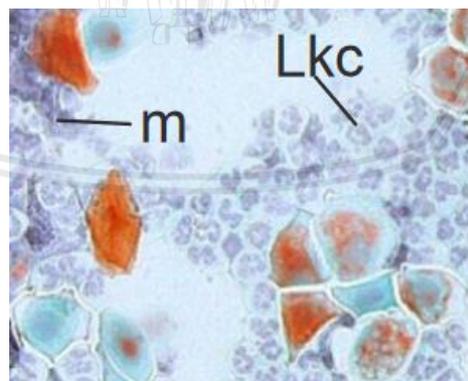
Gambar 2.5 Fase Estrus (Paccola, 2013).

Fase metestrus merupakan kelanjutan dari fase estrus dan berlangsung selama 21 jam. Fase metestrus ditandai dengan adanya dominasi sel-sel tanduk dan sel-sel leukosit pada pengamatan ulas vagina.



Gambar 2.6 Fase Metestrus (Paccola, 2013).

Fase diestrus merupakan fase kelanjutan dari fase metestrus dimana fase ini merupakan fase terpanjang diantara fase lainnya yakni terjadi selama 60 – 70 jam. Pengamatan dengan ulas vagina menunjukkan adanya dominasi sel leukosit dalam jumlah yang sangat banyak disertai dengan mucus dan epitel berinti.



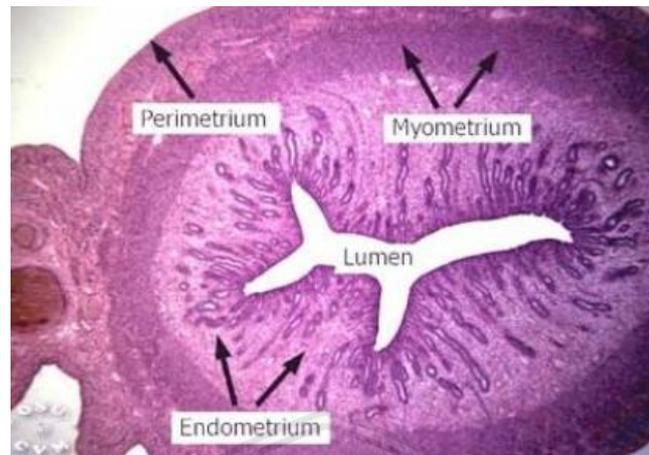
Gambar 2.7 Fase Diestrus (Paccola, 2013).

2.2.2 Sistem Reproduksi Tikus Betina

Secara umum sistem reproduksi terdiri dari organ reproduksi primer dan saluran reproduksi. Organ reproduksi primer pada betina adalah ovarium. Ovarium memiliki fungsi eksokrin yakni menghasilkan sel telur (ovum) dan fungsi endokrin menghasilkan hormon kelamin yaitu estrogen dan progesteron. Ovarium merupakan tempat berkembangnya folikel yakni folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel de Graaf, korpus rubrum, korpus luteum dan korpus albikan. Saluran reproduksi betina terdiri dari oviduk dan uterus. Oviduk memiliki fungsi kerja kapasitasi sperma, fertilisasi, dan pembelahan embrio yang terjadi dibagian ampula dan pengangkutan ovum ke uterus. Alat reproduksi luar terdiri dari vagina dan vulva yang berfungsi sebagai tempat penumpahan semen dari individu jantan (Yatim, 1994).

2.2.2.1 Uterus

Uterus merupakan bagian organ reproduksi betina yang memiliki struktur saluran muskuler yang diperlukan untuk menerima dan tempat berkembangnya ovum yang sudah dibuahi, implantasi fetus dan penyediaan nutrisi. Pada mamalia terdapat empat jenis uterus yang beragam pada setiap spesies yakni uterus dupleks, uterus bikornis, uterus bipartitis, dan uterus simpleks. Uterus tikus berbentuk tabung ganda dan termasuk dalam tipe dupleks yang bercirikan mempunyai dua buah serviks, dua kornua yang terpisah, serta tidak memiliki korpus uteri (Amita, 2015).



Gambar 2.8 Gambaran histologi uterus tikus putih perbesaran 40x pewarnaan HE (Cavalcanto, 2007).

Uterus tersusun atas beberapa lapisan yakni lapisan perimetrium, myometrium, dan endometrium. Lapisan perimetrium merupakan lapisan terluar yang terdiri atas selapis sel mesotel yang ditopang oleh jaringan ikat tipis. Lapisan myometrium berupa dinding otot polos padat dengan serat otot yang tersusun dalam berkas-berkas yang satu sama lainnya dipisahkan oleh jaringan ikat. Lapisan endometrium atau mukosa, melekat dengan lapisan myometrium. Endometrium dilapisi oleh epitel silindris selapis dan diantara epitel tersebut terdapat kelompok sel bersilia. Pada lapisan endometrium uterus terdapat jaringan ikat kolagen yang mana perubahan struktur kolagen sangat dipengaruhi oleh hormon estrogen. Kolagen adalah struktur penunjang pada uterus sebagai indikasi kepesatan pertumbuhan kelenjar yang akan berfungsi sebagai wadah nutrisi bagi embrio yang disebut dengan *uterine milk*. Perubahan struktur dan fungsi uterus sangat dipengaruhi oleh siklus hormonal (Desfariza, 2016).

2.3 Hormon Reproduksi Betina

Proses reproduksi sangat erat kaitannya dengan mekanisme sistem hormonal, yaitu hubungan antara hormon-hormon hipotalamus dan hipofisa yakni *Gonadotrophin releasing hormone* (GnRH), *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), hormon-hormon ovarium (estrogen dan progesteron) dan hormon uterus (prostaglandin) (Hafez dan Hafez, 2000).

- *Gonadotropin Relasing Hormon* (GnRH)

GnRH adalah hormon yang dihasilkan oleh hipotalamus, yang menstimulasi banyak sel gonadotrop pada hipofisa anterior. Pengeluaran GnRH di hipotalamus diatur oleh nukleus arkuata yang memiliki neuron untuk memproduksi dan melepas gelombang GnRH ke hipofisa. Gonadotropin meliputi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang disekresikan oleh kelenjar hipofisa anterior (Hafez dan Hafez, 2000).

- *Follicle Stimulating Hormon* dan *Luteinizing Hormon*

Kelenjar hipofisa mensekresikan hormon gonadotropin FSH dan LH. Kedua hormon ini sangat penting dalam produksi ovum di ovarium dan pelepasan hormon - hormon gonad yakni estradiol dan progesteron. Fungsi utama FSH adalah menstimulus pertumbuhan dan pematangan folikel di dalam ovarium. LH dengan FSH bekerja sama sebagai stimulus pematangan folikel dan pelepasan estrogen. Sesudah pematangan folikel, akan terjadi ovulasi oleh LH dengan menggerak pemecahan dinding sel dan pelepasan ovum. LH ikut berpengaruh terhadap pembentukan korpus luteum yang

berasal dari folikel yang sudah pecah. FSH dan LH mempengaruhi terjadinya perbedaan lama estrus dan waktu ovulasi pada tiap spesies (Asren, 2015).

- Progesteron

Progesteron adalah hormon penting yang berhubungan dengan reproduksi yang disekresikan oleh sel - sel luteal corpus luteum (CL) . Progesteron berfungsi menghambat sekresi FSH serta LH dan menjaga kebuntingan dengan cara mempersiapkan uterus untuk implantasi melalui peningkatan glandula sekretori di dalam endometrium dan menghambat motilitas myometrium (Hafez dan Hafez, 2000).

- Prostaglandin

Prostaglandin ($\text{PGF2}\alpha$) merupakan hormon yang diproduksi didalam uterus. Selama masa kebuntingan, fetus menghambat sekresi $\text{PGF2}\alpha$ oleh uterus sehingga korpus luteum tetap dipertahankan. Prostaglandin merupakan hormon yang mengatur kontraksi otot polos pada saluran reproduksi, menstimulasi kontraksi uterus, serta meregenerasi korpus luteum (Asren, 2015).

- Estrogen

Estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh kelenjar endokrin pada sistem reproduksi betina. Estrogen pada mamalia dibagi dalam 3 jenis yakni estron, estriol dan estradiol. Estrogen jenis estradiol merupakan estrogen utama yang dihasilkan oleh sel teka interna pada ovarium. Estradiol

memiliki potensi lebih kuat dari estron dan estriol, berperan dalam memelihara korpus luteum agar tetap mensekresikan progesteron (Asren, 2015).

Estrogen bekerja dengan memodulasi sekresi LH dan FSH melalui sistem hipotalamus-hipofisis. Estrogen dapat berperan sebagai kontrol umpan balik negatif dengan menurunkan sekresi LH dan FSH, atau sebagai kontrol umpan balik positif dengan menstimulasi sekresi LH dan FSH. FSH bekerja mempengaruhi perkembangan ovum dan folikel ovarium. Perkembangan folikel ovarium dimulai dari folikel primer hingga menjadi folikel de graaf dimana akan terbentuk sel granulosa yang mensekresikan cairan folikular yang mengandung estrogen dalam konsentrasi tinggi sehingga pengumpulan cairan ini menyebabkan munculnya antrum di dalam masa sel granulosa. FSH yang berperan penting dalam perkembangan folikel, didalamnya terdapat sel granulosa dan sel teka interna yang dapat mensekresikan estrogen. Estrogen yang dihasilkan kemudian merangsang perkembangan sel folikel lainnya. Sekresi estrogen oleh ovarium memicu terjadinya ovulasi oleh LH pada masa estrus (Rejeki *et al.*, 2017).

Fungsi utama hormon estrogen adalah untuk merangsang birahi, merangsang timbulnya sifat - sifat kelamin sekunder, merangsang pertumbuhan dan perkembangan dari saluran ambing betina (Asren, 2015). Estrogen pada sistem reproduksi berfungsi untuk memicu proliferasi sel dan pertumbuhan jaringan pada organ-organ reproduksi dan jaringan lain yang berkaitan dengan reproduksi, salah satu diantaranya adalah uterus. Uterus merupakan salah satu jaringan target utama dari kerja hormon estrogen. Uterus yang terdiri dari

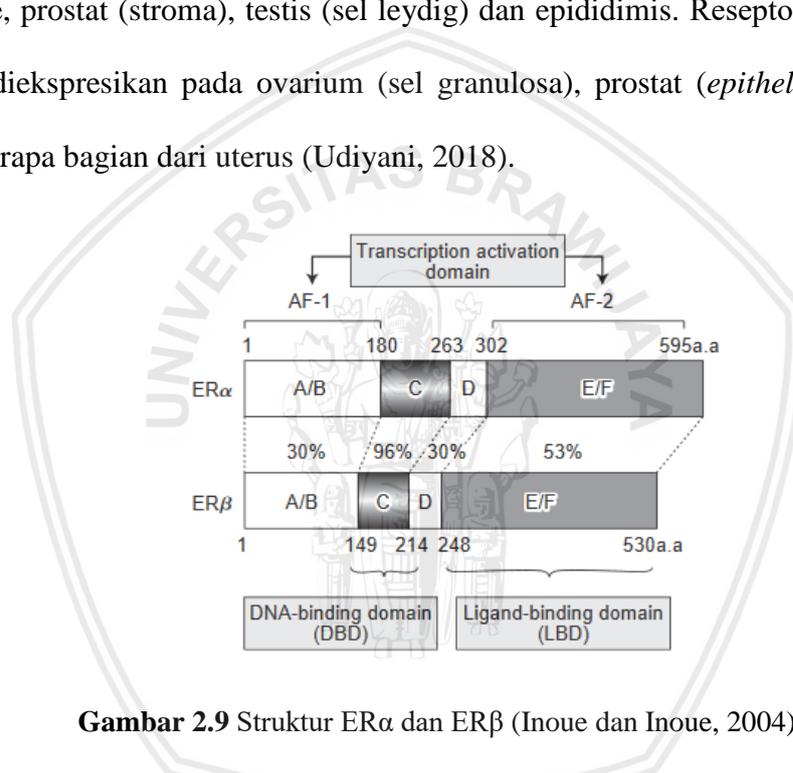
beberapa jenis sel heterogen (stroma, epitel luminal, epitel glandular, dan otot polos) akan mengalami perubahan proliferasi dan diferensiasi yang tersinkronisasi secara terus menerus sebagai respon terhadap perubahan kadar estrogen dan progesteron. Estrogen, dengan mengatur gen target estrogen dengan cara spesifik sel, memiliki efek berbeda pada berbagai jenis sel dalam uterus. Uterus tikus yang belum dewasa (usia 21 hari) memiliki tingkat proliferasi sel yang sangat rendah. Proliferasi dimulai pada masa pubertas sebagai respon terhadap siklus estrogen. Estrogen berfungsi dalam menginduksi proliferasi sel epitel uterus dan stroma endometrium (Weihua *et al.*, 2000). Estrogen dalam menjalankan fungsinya membutuhkan reseptor estrogen (ERs) yang dikendalikan oleh gen pada kromosom untuk bekerja dalam jaringan atau sel target tersebut (Prasetyo, 2016).

2.4 Reseptor Estrogen

Estrogen dapat memberikan efek pada organ dan jaringan target apabila pada organ dan jaringan tersebut memiliki reseptor estrogen. Reseptor estrogen termasuk dalam kelompok protein yang diaktifkan oleh hormon estrogen dan ditemukan di dalam sel. Estrogen berikatan dengan reseptor estrogen (ERs) membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Estrogen akan berikatan dengan reseptornya dengan cara menembus permukaan sel dan masuk ke dalam sel (sitoplasma) kemudian berikatan dan membentuk ikatan hormon reseptor pada *Estrogen Responsive Element* yang kemudian bergerak menuju inti sel untuk berikatan dengan DNA (Speroff dan Fritz, 2005). Reseptor estrogen akan bersifat inaktif apabila hormon

estrogen tidak ada dan akan berada di dalam inti sel target berikatan dengan *heat shock protein* (McDonnel dan Norris, 2002).

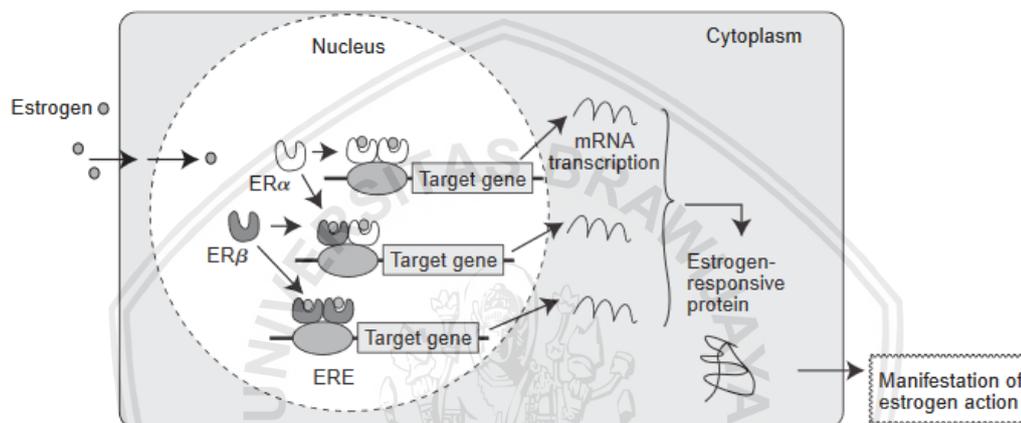
Reseptor estrogen dibagi menjadi dua yakni reseptor estrogen α dan β . Keduanya diekspresikan pada organ dan jaringan yang berbeda. Reseptor estrogen α banyak diekspresikan terutama pada organ ovarium (sel teka), uterus, kelenjar mammae, prostat (stroma), testis (sel leydig) dan epididimis. Reseptor estrogen β banyak diekspresikan pada ovarium (sel granulosa), prostat (*epithelium*), testis, dan beberapa bagian dari uterus (Udiyani, 2018).



Gambar 2.9 Struktur ER α dan ER β (Inoue dan Inoue, 2004).

Susunan asam amino ER α berhubungan erat dengan ER β , karena domain C (DBD) ER β 96% identik dengan ER α , sedangkan domain E (LBD) ER β menunjukkan kemiripan 53% dengan ER α (**Gambar 2.9**). Ada kesamaan keseluruhan fungsi fisiologis antara ER α dan ER β , namun mungkin ada perbedaan fungsional antara kedua ERs berdasarkan varian struktural mereka. Beberapa domain fungsional biasanya terlibat dalam aktivasi transkripsi reseptor. Domain A/B dan E/F dikenal sebagai dua domain yang sangat penting dalam proses

aktivasi transkripsi AF-1 (fungsi aktivasi-1) maupun AF-2. Sehubungan dengan aktivasi transkripsi ini, ER β memiliki AF-1 yang lebih pendek daripada ER α . Analisis fungsional AF-1 dan AF-2 mungkin berguna untuk memahami perbedaan mesin transaktivasi dan spesifikasi antara ER α dan ER β dimana sampai saat ini belum diketahui (Inoue dan Inoue, 2004).



Gambar 2.10 Mekanisme aksi estrogen (Inoue dan Inoue, 2004).

Reseptor estrogen (ERs) adalah anggota superfamili reseptor untuk steroid, asam retinoat, hormon tiroid, dan vitamin D, yang berfungsi sebagai faktor transkripsi yang bergantung pada ligan. Di dalam nukleus, estrogen berikatan dengan ERs melalui domain E/F yang mengikat ligand domain (LBD). ERs yang terikat estrogen selanjutnya berikatan dengan *Estrogen Responsive Element* (EREs) genomik dalam bentuk dimerisasi melalui *DNA-binding domain* acental (DBD) pada domain C, dan dengan demikian mengontrol transkripsi gen target untuk mengarahkan tindakan fisiologis tertentu (**Gambar 2.10**).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

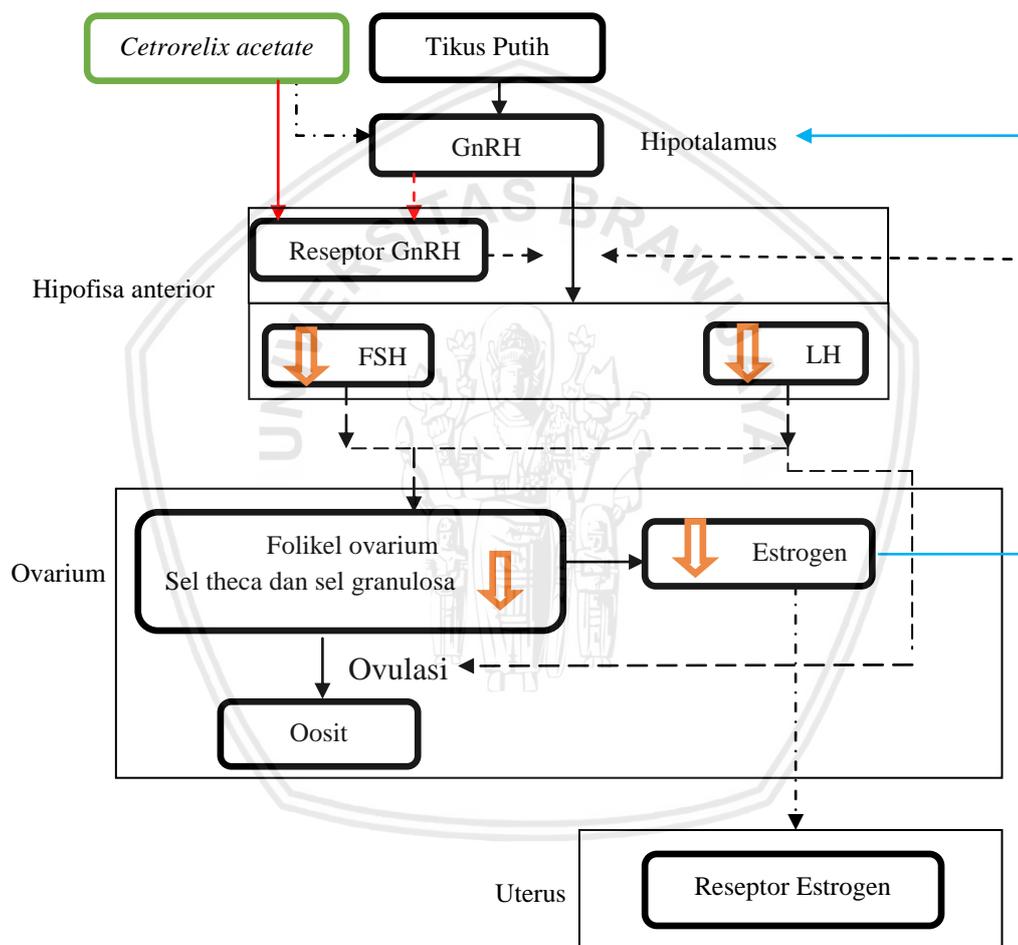
3.1 Kerangka Konseptual

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Wistar* akan diberikan injeksi *Cetrorelix acetate* yang merupakan GnRH antagonis dimana kerjanya bersaing dengan GnRH dalam tubuh untuk mengikat reseptor GnRH pada hipofisa anterior. Adanya *Cetrorelix acetate* dalam tubuh yang mengikat reseptor GnRH akan menghalangi kerja GnRH untuk memicu hipofisa anterior menghasilkan FSH dan LH.

Hormon FSH dan LH berperan dalam pertumbuhan dan pemasakan folikel ovarium serta sekresi estrogen. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) mempengaruhi perkembangan ovum dan folikel ovarium. Produksi FSH pada hipofisa anterior menyebabkan folikel menjadi berongga dan menghasilkan hormon estrogen. Sekresi estrogen oleh ovarium memicu pelepasan LH untuk ovulasi pada masa estrus. LH kemudian merangsang pembentukan korpus luteum, sedangkan estrogen mempengaruhi sekresi hormon gonadotropin hipofisis melalui efek umpan balik (Mardiati dan Sitasiwi, 2008).

Estrogen merupakan hormon steroid yang diperlukan dalam pertumbuhan folikel dan berlangsungnya estrus pada hewan betina. Estrogen membutuhkan reseptor estrogen (ERs) yang dikendalikan oleh gen pada kromosom untuk bekerja dalam jaringan atau sel target. Estrogen berperan penting dalam perkembangan organ dan sistem reproduksi betina. Peran estrogen diantaranya

menstimulasi pertumbuhan lapisan endometrium uterus dalam mempersiapkan implantasi embrio (Guyton dan Hall, 2006). Perubahan struktur histologi uterus disebabkan adanya reseptor estrogen (ERs) pada lapisan penyusun dinding uterus sehingga struktur lapisan tersebut berubah seiring dengan perubahan kandungan hormon estrogen (**Gambar 3.1**).



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- Cetorelix acetate : Pemberian *Cetorelix acetate*
- : Berikatan
- : *Feedback*
- - - → : Tidak berikatan
- - - → : Menghambat
- : Menghasilkan / menstimulasi

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat penurunan ekspresi reseptor estrogen (ERs) dan perubahan gambaran histopatologi uterus tikus putih hasil induksi GnRH antagonis yakni *Cetrorelix acetate*.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan dari Desember 2018 – Januari 2019 di beberapa laboratorium yakni Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Ilmu dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang untuk pemeliharaan hewan coba, Laboratorium Patologi Anatomi Kessima Medika untuk pembuatan preparat histologi, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran untuk pembuatan preparat immunohistokimia dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk pengamatan preparat histologi..

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, sarung tangan, masker, *ice box*, kertas label, pot organ, papan seksi, gunting tajam-tumpul, pinset anatomis, pinset chirurgis, spuit 1 ml, cover glass, object glass, mikrotom, pisau mikrotom, mikroskop dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*), kapas, tissue kering, sabun cuci tangan, *Cetrorelix acetate*, formalin 10 %, *aquadest*, *aquapro injection*, alkohol 70%, pewarna Giemsa, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, ethanol 70%, ethanol, 80%, ethanol 90%, ethanol 95%, ethanol 100%, *diaminobenzidine* (DAB), biotin, *normalserum*

bovine, BSA, Phosphate Buffer Saline (PBS), entellan, pewarna hematoxylin-eosin (HE), sekam dan pakan tikus.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan coba menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-9 minggu dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi banyaknya sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery dan Kowalsky, 2011):

$$\begin{array}{l} t(n-1) \geq 15 \\ 3(n-1) \geq 15 \\ 3n - 3 \geq 15 \end{array} \quad \begin{array}{l} \rightarrow 3n \geq 18 \\ n \geq 6 \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{Keterangan :} \\ t : \text{Jumlah perlakuan} \\ n : \text{Jumlah ulangan yang diperlukan} \end{array}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka setiap kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 6 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 18 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba dalam penelitian akan memintai sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (**Lampiran 1**).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dengan subyek yang dibagi menjadi 3 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
K – (Kontrol Negatif)	Tidak diberi perlakuan
P1	<i>Cetrorelix acetate</i> 0,009 mg/ekor
P2	<i>Cetrorelix acetate</i> 0,0135 mg/ekor

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : *Cetrorelix acetate*

Variabel terikat : Ekspresi reseptor estrogen dan gambaran histopatologi uterus

Variabel kontrol : Tikus, berat badan, umur, suhu, pakan, minum, dan kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba
2. Swab vagina
3. Induksi *Cetrorelix acetate*
4. Euthanasia dan pengambilan organ uterus
5. Pembuatan dan pengamatan histopatologi uterus
6. Pengamatan ekspresi reseptor estrogen pada uterus dengan IHK
7. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini akan menggunakan 18 ekor tikus yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Ilmu dan Teknologi Universitas Islam

Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Tikus yang digunakan termasuk dalam strain Wistar dengan ketentuan betina, berumur 8-9 minggu dengan bobot rata-rata per ekornya 150-200 gram. Tikus diadaptasikan selama 7 hari sebelum perlakuan di kandang yang terpisah dan sudah digolongkan menurut kisaran berat badannya yang paling mendekati. Tikus dibagi dalam 3 kelompok dimana 1 kelompok berisi 6 ekor tikus. Pemberian pakan dan minum secara *ad-libitum*.

4.7.2 Swab Vagina

Swab vagina dilakukan dengan cara sebagai berikut, cotton bud yang akan digunakan untuk swab direndam terlebih dahulu dalam *aquadest* sebelum digunakan, kemudian diulaskan pada dinding vagina membuat rotasi 360°. Hasil ulasan dioleskan secara merata pada object glass, difiksasi dengan methanol selama 5 menit dan diwarnai dengan Giemsa 10% selama 30 menit. Object glass selanjutnya dicuci pada air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10x10 dan 40x10. Penentuan fase siklus estrus dari hasil ulas vagina dilakukan berdasarkan keberadaan sel-sel epitel vagina dan jumlah kuantitatif sel-sel epitel vagina.

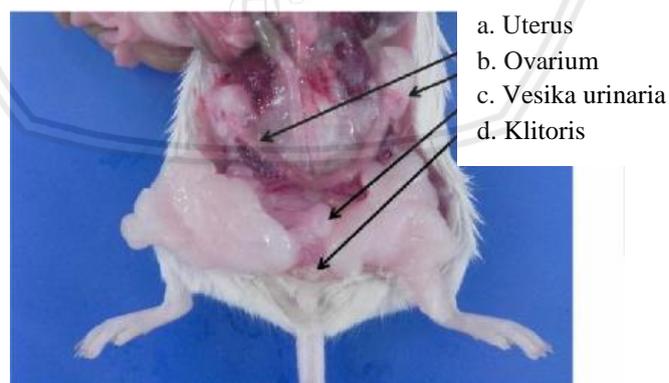
4.7.3 Injeksi *Cetrorelix acetate*

Tikus yang sudah diadaptasi akan dibagi dalam 3 kelompok perlakuan (**Tabel 4.1**). Perlakuan diberikan kepada kelompok P1 dan P2 dimana dosis yang diberikan berbeda namun *handling* dan cara pemberiannya sama. Tikus diambil dari kandang, di-*handling* menggunakan kedua tangan, tangan kiri me-*restrain* bagian tubuh dan tangan kanan memegang ekor tikus. Posisi tikus ke laboran yang

memberikan injeksi yakni bagian ventral mengarah ke laboran. Daerah yang akan diinjeksi dibersihkan dengan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol 70% dan injeksi dilakukan melalui subkutan di daerah abdomen. Pemberian *Cetrorelix acetate* pada manusia sebesar 0,25 mg/mL, dari catatan tersebut dikonversikan menjadi dosis tikus dan didapatkan dosis sebesar 0,0045 mg/ekor tikus. Penelitian ini akan menggunakan dosis baru yakni pemberian 0,009 mg dan 0,0135 mg *Cetrorelix acetate* per ekor (**Lampiran 3**).

4.7.4 Euthanasia dan pengambilan organ uterus

Euthanasia hewan coba dilakukan dengan cara dislokasi *os.occipital*. Cara melakukan dislokasi pada tikus yaitu dengan meletakkan ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher pada dasar tengkorak untuk memberi tekanan ke bagian posterior dasar tulang tengkorak dan sumsum tulang belakang, sementara tangan lainnya pada bagian ekor menarik dengan cepat sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tengkorak.



Gambar 4.1 Reproduksi Tikus Betina (Cavalcanto, 2007).

Nekropsi tikus dilakukan di atas papan seksi dengan posisi rebah dorsal dan seluruh ekstremitasnya difiksasi jarum pentul. Bagian abdomen dibuka untuk

koleksi organ uterus. Sampel uterus yang didapat dimasukkan dalam pot organ yang berisi formalin 10% untuk selanjutnya dibuat preparat histopatologi.

4.7.5 Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi uterus

Pembuatan preparat histopatologi menggunakan metode parafin dengan pewarnaan hematoxylin-eosin (**Lampiran 4**). Pembuatan preparat histopatologi dengan pewarnaan HE yang meliputi tahap fiksasi, tahap dehidrasi, *cleaning*, infiltrasi, *embedding*, *sectioning* dan pewarnaan untuk menentukan perubahan struktur jaringan uterus.

1. Tahap Fiksasi

Pada tahap ini, uterus yang sudah dikoleksi dalam pot organ difiksasi pada larutan formalin 10% selama minimal 1 hari penyimpanan.

2. Tahap Dehidrasi

Pada tahap ini, uterus yang telah difiksasi kemudian di-*trimming* lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette* dan dicuci air mengalir selama 30 menit dan didehidrasi pada larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95% serta ethanol absolute I, II, III selama masing-masing 1 jam.

3. Tahap *Clearing-Infiltrasi* Parafin

Sampel dari ethanol absolute III dimasukkan ke dalam larutan xylol I, II, III masing-masing 20 menit hingga tampak transparan kemudian dimasukkan ke dalam parafin cair I, II, III dalam incubator bersuhu 58-60⁰C masing-masing 20 menit.

4. Tahap *Embedding*

Parafin IV disiapkan dan dicairkan di atas kompor listrik. *Tissue cassette* dari parafin III dikeluarkan dan diletakkan di atas alas di atas kompor listrik. Parafin IV dituangkan ke dalam cetakan parafin dan sampel organ ditanam pada cetakan tersebut lalu ditutup dengan *tissue cassette*. Parafin yang telah padat kemudian disimpan dalam *freezer*.

5. Tahap *Sectioning*

Blok parafin padat yang berisi sampel organ dipasang ke dalam alat mikrotom. Diratakan sampai mendapatkan organ selanjutnya dipotong dengan ketebalan 5 μm . Potongan kemudian diletakkan di wadah berisi air, diambil dengan object glass dan dicelupkan ke waterbath berisi air dengan suhu berkisar pada 40°C. Object glass yang sudah terdapat potongan jaringan diangin-anginkan terlebih dahulu sebelum masuk ke tahapan berikutnya.

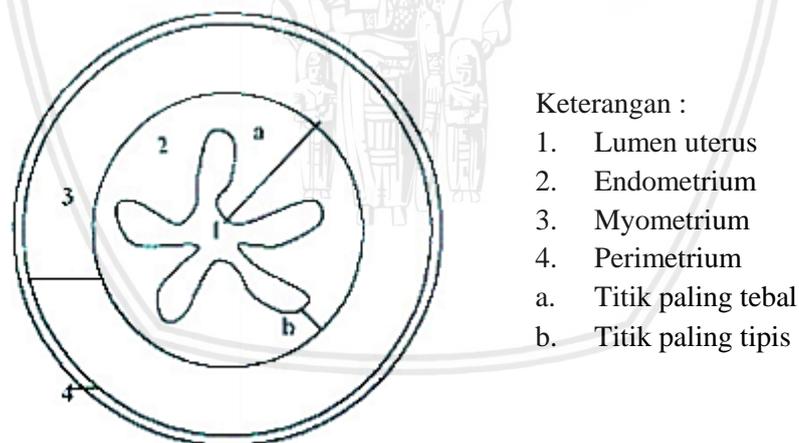
6. Tahap Pewarnaan / *Staining*

Object glass masuk ke dalam staining jar dan diberi larutan xylol I untuk memulai proses deparafinisasi dilanjutkan xylol II dan xylol III masing-masing 20 menit.

Object glass diberi larutan ethanol absolute I untuk memulai proses rehidrasi dilanjutkan ke ethanol absolute II, III, alkohol 95%, 90%, 80%, 70% masing-masing 5 menit. Object glass diberi larutan hematoxyline sebagai pewarna inti sel selama 10 menit kemudian diberi larutan alkohol asam 4 detik untuk menghilangkan pewarna hematoxyline dan dicuci dengan air mengalir selama 20 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dilanjutkan

dengan tahapan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% dan ethanol absolute I, II, III masing-masing selama 5 detik, setelah itu dilakukan proses clearing dengan xylol I, II selama 10 menit dan xylol III selama 15 menit, kemudian ditutup dengan kaca penutup dan siap untuk diamati.

Variabel yang akan diamati adalah lapisan endometrium dimana ketebalan lapisan endometrium akan diukur dimulai dari lapisan yang berbatasan dengan lumen uterus sampai batas antara endometrium dan myometrium. Pengukuran tebal endometrium pada 18 sampel sediaan histologi uterus tikus dengan pengulangan pengukuran untuk masing-masing ekor adalah 10 kali. Ketebalan lapisan diperoleh dari rerata 5 titik paling tipis dan 5 titik paling tebal (Puspitadewi dan Sunarno, 2007).



Gambar 4.2 Skema Pengukuran Tebal Endometrium (Puspitadewi dan Sunarno, 2007).

4.7.6 Pengamatan ekspresi reseptor estrogen pada uterus dengan IHC

Pembuatan preparat immunohistokimia dilakukan untuk mengamati ekspresi reseptor estrogen (**Lampiran 5**). Tahap awal dimulai dengan proses deparafinisasi, sebelumnya slide jaringan yang belum diwarnai akan diinkubasi

dalam inkubator minimal 24 jam untuk mempermudah deparafinisasi. Deparafinisasi dilakukan dengan direndam dengan xylol sebanyak tiga kali ulangan. Proses selanjutnya yakni rehidrasi dalam larutan alkohol bertingkat (alkohol absolut. 95%. 90%, 80%, dan 70%), lalu diangkat dan disimpan dalam lemari es 3° C selama 24 jam. Preparat dicuci dalam akuades sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Tahap awal pewarnaan IHK adalah proses perendaman slide dalam larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% yang dicampur dengan metanol dalam *humidity chamber* suhu ruang selama 40 menit, kemudian dicuci dalam PBS dengan selama 3 x 3 menit.. Tahap berikutnya, slide diinkubasi dengan *normalhorse serum* 2,5% sebanyak 50µl dalam *humidity chamber* suhu 3°C selama satu malam. Setelah proses inkubasi, slide dibilas kembali dengan PBS 3 x 3 menit. Selanjutnya dilakukan inkubasi slide dengan antibodi primer (anti reseptor estrogen) 40 µL selama satu malam pada suhu 3°C, kemudian dibilas kembali dengan PBS selama 3 x 5 menit lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti anti-reseptor estrogen) 40 µL selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 3 menit.dan diinkubasi dengan *peroksidase* satu tetes, dibiarkan selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 3 menit. Preparat dibilas lagi dengan akuades hingga bersih.

Preparat ditambahkan kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) 40 µL selama 20 menit suhu ruang kemudian dicuci dalam akuades 3 x 5 menit dan ditetesi dengan *hematoksilin* selama 1 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci kembali dalam air dengan pH 8 3 x 1 menit dan dibiarkan

kering, dilakukan *mounting* dengan entelan dan siap untuk diamati. Visualisasi adanya reaksi positif dilakukan dengan meneteskan larutan kromogen *diaminobenzidine* (DAB) selama 3-4 menit sambil diamati adanya perubahan warna. Pada jaringan yang menunjukkan reaksi positif akan tervisualisasi dengan adanya warna coklat (Wahyuni *et al.*, 2019).

4.7.7 Analisis data

Data yang diamati dan dianalisis adalah gambaran histopatologi uterus dan ekspresi reseptor estrogen pada uterus. Histopatologi uterus akan dihitung perubahan ketebalan endometrium melalui pewarnaan HE sedangkan ekspresi reseptor estrogen pada uterus akan diamati dan dihitung melalui pewarnaan IHK dan *Immunoratio*. Keduanya akan diamati secara kuantitatif dan data yang diperoleh dari hasil pengamatan dianalisa dengan Oneway ANOVA dengan probabilitas 5% yang dilanjutkan dengan Uji BNJ.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

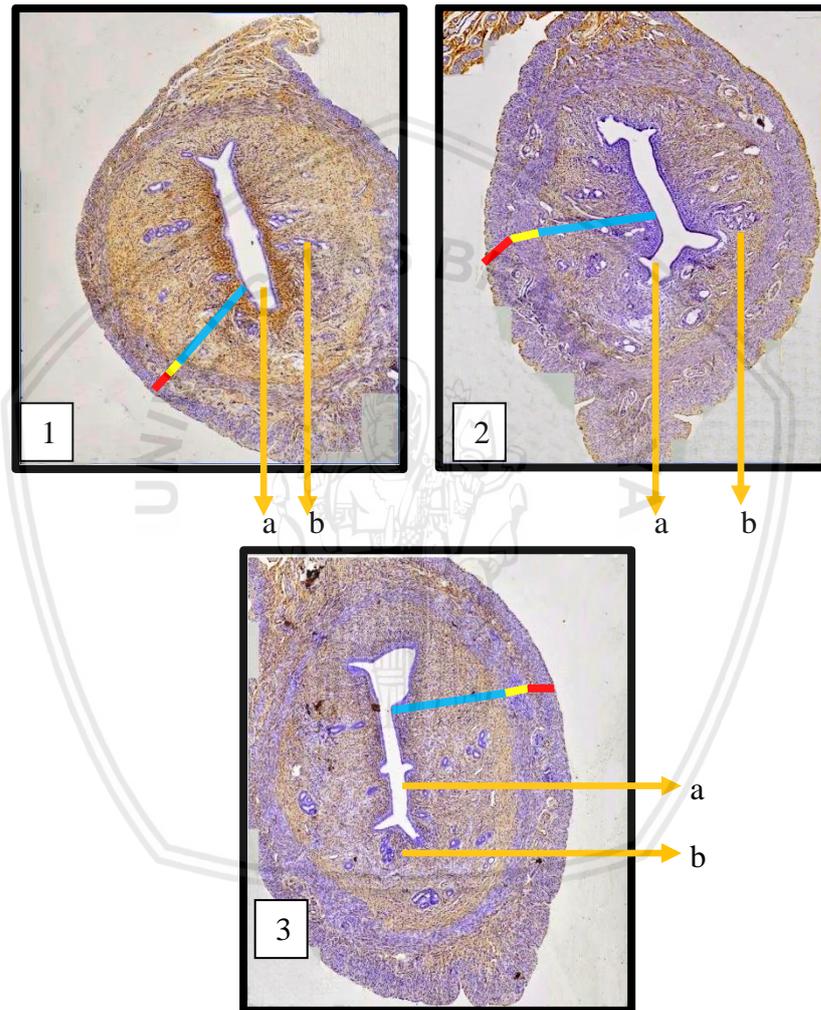
5.1 Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen (ERs) Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hormon estrogen merupakan hormon reproduksi utama pada hewan betina yang disekresikan oleh sel teka dan sel granulosa dalam folikel ovarium. Hormon estrogen memiliki peran penting dalam berbagai proses fisiologis seperti diferensiasi organ kelamin betina, siklus reproduksi dan kebuntingan (Wahyuni *et al.*, 2019). Peran tersebut dapat muncul apabila terjadi ikatan antara hormon estrogen dan reseptornya (Murray *et al.*, 2009). Reseptor memiliki fungsi utama sebagai faktor DNA-binding transcription yang mengatur ekspresi gen (Pratoko, 2012). Salah satu contohnya adalah hormon estrogen yang dapat aktif bekerja apabila pada organ target terdapat reseptor estrogen (ERs) (Wahyuni *et al.*, 2019).

Reseptor estrogen terdiri dari dua jenis yakni reseptor estrogen α (ER α) dan reseptor estrogen β (ER β). Diperkirakan selama bertahun-tahun hanya terdapat satu jenis ERs, tetapi beberapa penelitian selanjutnya membuktikan bahwa terdapat lebih dari satu jenis ERs. Hal ini dibuktikan dengan adanya efek estrogen pada jaringan target yang tidak ditemukan ER α didalamnya (Lund, 2005).

Reseptor estrogen α dan β memiliki jaringan target yang berbeda dalam tubuh. ER α mendominasi terutama pada organ ovarium (sel teka), uterus, kelenjar mammae, prostat (stroma), testis (sel leydig) dan epididimis. ER β berperan kecil pada lokasi yang didominasi ER α , tetapi berperan penting pada ovarium (sel

granulosa), prostat (*epithelium*), testis, dan beberapa bagian dari uterus (Udiyani, 2018). Reseptor estrogen α dan β dalam jaringan target dapat dilihat melalui metode immunohistokimia dengan melihat ekspresi atau hasil pewarnaannya yang menunjukkan warna coklat (Wahyuni *et al.*, 2019).



Gambar 5.1 Ekspresi ER α pada uterus tikus putih (40x)

Keterangan: (1) Kontrol negatif

(2) Kelompok P1 (*Cetorelix acetate* 0,009 mg)

(3) Kelompok P2 (*Cetorelix acetate* 0,0135 mg)

(—) Endometrium

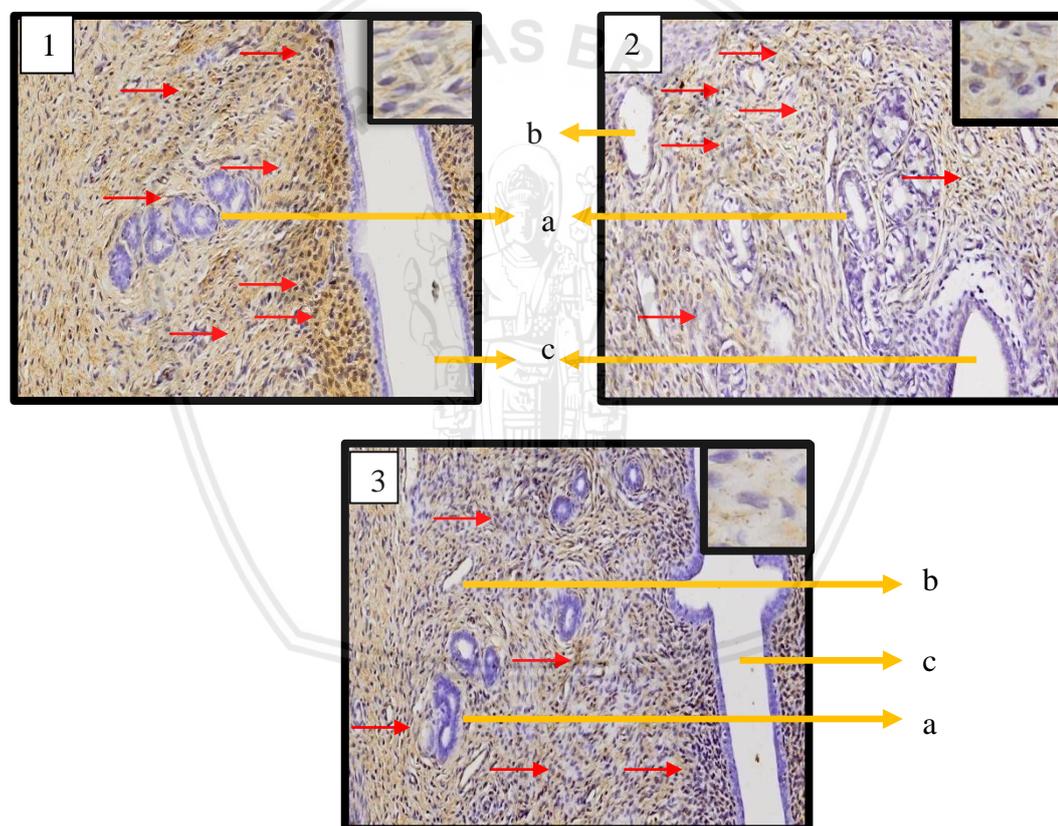
(—) Myometrium

(—) Perimetrium

(a) Lumen uterus

(b) Kelenjar uterus

Ekspresi reseptor estrogen α pada uterus dapat diamati pada daerah inti sel epitel kelenjar dan lapisan endometrium (Hiroi *et al.*, 1999). Menurut Wang *et al.*, (2000) ER α juga terdeteksi pada bagian stroma dan myometrium, sedangkan Wahyuni *et al.*, (2019) menyatakan bahwa ekspresi ER α pada uterus tikus dapat diamati pada endometrium, kelenjar uterus, myometrium, dan epitel luminal. Ekspresi reseptor estrogen α pada uterus hasil induksi GnRH antagonis dapat diamati pada daerah endometrium (**Gambar 5.1**)



Gambar 5.2 Ekspresi ER α pada uterus tikus putih (100x dan 1000x)

- Keterangan:
- (1) Kontrol negatif
 - (2) Kelompok P1 (*Cetrorelix acetate* 0,009 mg)
 - (3) Kelompok P2 (*Cetrorelix acetate* 0,0135 mg)
 - (a) Kelenjar uterus
 - (b) Pembuluh darah
 - (c) Lumen uterus
 - (→) Ekspresi ER α

Hasil perhitungan rata-rata ekspresi ER α pada uterus tikus yang diperoleh dari kelompok kontrol negatif adalah $46,28 \pm 7,7$, kelompok perlakuan P1 adalah $34,35 \pm 1,9$, dan kelompok perlakuan P2 adalah $25,15 \pm 6,7$. Ekspresi ER α pada kelompok perlakuan P1 dan P2 keduanya mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hasil ekspresi ER α menunjukkan kelompok kontrol negatif dengan nilai $46,28 \pm 7,7$ lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan P1 yakni $34,35 \pm 1,9$ dengan penurunan sebesar 25% dan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2 terjadi penurunan sebesar 45%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis *Cetrorelix acetate* maka semakin rendah ER α yang diekspresikan pada uterus tikus putih (**Gambar 5.2** dan **Tabel 5.1**).

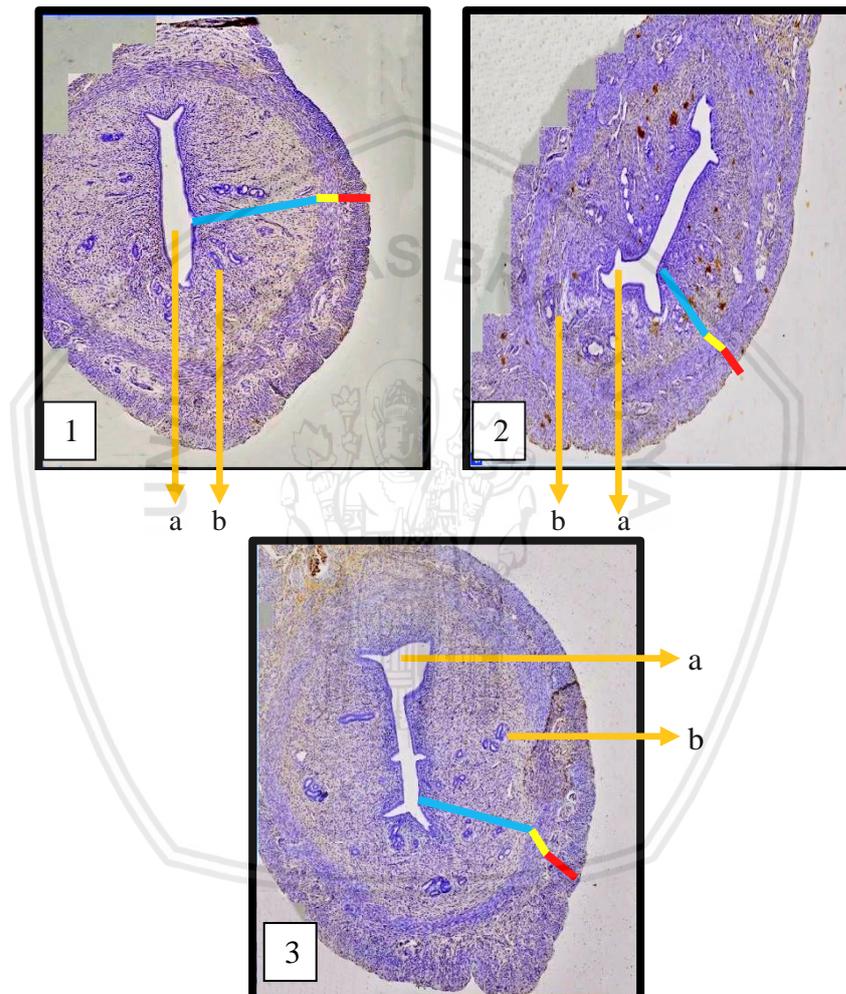
Tabel 5.1 Pengaruh GnRH antagonis terhadap ekspresi ER α uterus tikus putih

Kelompok	Rata-rata ekspresi ER α \pm SD	Rata-rata ekspresi ER α \pm SD	
		Peningkatan terhadap K-	Penurunan terhadap K-
K- (Kontrol negatif)	$46,28 \pm 7,7^c$	-	-
P1 (<i>Cetrorelix acetate</i> 0,009 mg/ekor)	$34,35 \pm 1,9^b$	-	25%
P2 (<i>Cetrorelix acetate</i> 0,0135 mg/ekor)	$25,15 \pm 6,7^a$	-	45%

Keterangan: Notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

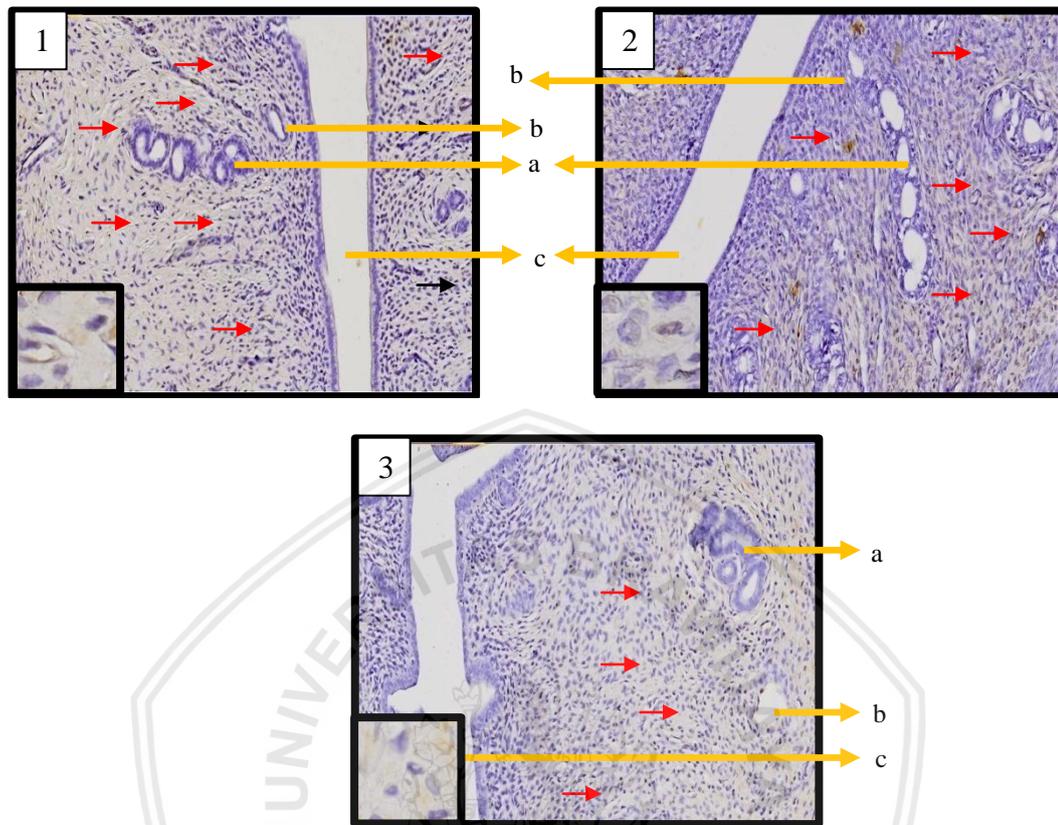
Reseptor estrogen β pada uterus diekspresikan tidak sebanyak ekspresi reseptor estrogen α (Lund, 2005). Reseptor estrogen β pada uterus tikus diekspresikan di inti epitel kelenjar dan luminal, sedangkan pada myometrium tidak ada ekspresi yang terdeteksi (Hiroi *et al.*, 1999). Wada-Hiraike *et al.* (2006)

menyatakan bahwa kedua reseptor baik reseptor estrogen α maupun β diekspresikan dalam stroma dan epitel kelenjar. Ekspresi reseptor estrogen β pada uterus hasil induksi GnRH antagonis dapat diamati pada daerah endometrium (Gambar 5.3)



Gambar 5.3 Ekspresi ER β pada uterus tikus putih (40x)

- Keterangan: (1) Kontrol negatif
 (2) Kelompok P1 (*Cetrorelix acetate* 0,009 mg)
 (3) Kelompok P2 (*Cetrorelix acetate* 0,0135 mg)
 (—) Endometrium
 (—) Myometrium
 (—) Perimetrium
 (a) Lumen uterus
 (b) Kelenjar uterus



Gambar 5.4 Ekspresi ER β pada uterus tikus putih (100x)

Keterangan: (1) Kontrol negatif

(2) Kelompok P1 (*Cetorelix acetate* 0,009 mg)

(3) Kelompok P2 (*Cetorelix acetate* 0,0135 mg)

(a) Kelenjar uterus

(b) Pembuluh darah

(c) Lumen uterus

(→) Ekspresi ER β

Tabel 5.2 Pengaruh GnRH antagonis terhadap ekspresi ER β pada tikus putih

Kelompok	Rata-rata ekspresi ER β \pm SD	Rata-rata ekspresi ER α \pm	
		Peningkatan terhadap K-	Penurunan terhadap K-
K- (Kontrol negatif)	20,18 \pm 1,6 ^c	-	-
P1 (<i>Cetorelix acetate</i> 0,009 mg/ekor)	13,81 \pm 2,3 ^b	-	31,5%
P2 (<i>Cetorelix acetate</i> 0,0135 mg/ekor)	4,90 \pm 3,7 ^a	-	75,7%

Keterangan: Notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

Hasil perhitungan rata-rata ekspresi ER β pada uterus yang diperoleh dari kelompok kontrol negatif adalah $20,18 \pm 1,6$, kelompok perlakuan P1 adalah $13,81 \pm 2,3$, dan kelompok perlakuan P2 adalah $4,90 \pm 3,7$. Ekspresi ER β pada kelompok perlakuan P1 dan perlakuan P2 mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Data yang diperoleh dari hasil ekspresi ER β menunjukkan kelompok kontrol negatif senilai $20,18 \pm 1,6$ lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan P1 $13,81 \pm 2,3$ dengan penurunan sebesar 31,5% dan dengan kelompok perlakuan P2 $4,90 \pm 3,7$ dengan penurunan sebesar 75,7%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis *Cetrorelix acetate* yang diberikan akan semakin rendah ekspresi ER β pada uterus tikus putih (**Gambar 5.4** dan **Tabel 5.2**).

Ekspresi reseptor estrogen pada kelompok kontrol negatif menunjukkan nilai rata-rata $46,28 \pm 7,7$ untuk ER α dan $20,18 \pm 1,6$ untuk ER β , yang menandakan nilai ER β pada uterus lebih sedikit daripada ER α . Hal ini didukung oleh Inoue dan Inoue (2004) yang menyatakan bahwa ekspresi ER β tidak begitu kuat pada organ yang sangat ekspresif terhadap ER α , seperti uterus, hipotalamus, dan hipofisis kelenjar, sementara ER β banyak diekspresikan di prostat dan ovarium.

Berbagai fungsi estrogen pada organ maupun jaringan dimediasi melalui reseptornya yaitu ERs. Reseptor estrogen adalah protein dua belas helix yang terletak di inti sel sebagai regulator transkripsional yang diaktifkan ligan. Karena reseptor berada di dalam sel, maka hanya bisa dipengaruhi oleh molekul yang

cukup kecil untuk melewati membran sel. Molekul tersebut mempengaruhi ERs untuk membentuk ikatan dan mempengaruhi DNA melalui transkripsi DNA dalam nukleus (Lund, 2005).

Ekspresi ER α maupun ER β mengalami penurunan pada kelompok perlakuan P1 pemberian *Cetrorelix acetate* 0,009 mg/ekor dan P2 pemberian *Cetrorelix acetate* 0,0135 mg/ekor. Nilai rata-rata ekspresi ER α kelompok perlakuan P1 adalah $34,35 \pm 1,9$ dengan penurunan sebesar 25% dan kelompok perlakuan P2 terjadi penurunan sebesar 45%. Ekspresi ER β pada kelompok perlakuan P1 $13,81 \pm 2,3$, dan kelompok perlakuan P2 $4,90 \pm 3,7$. Dilihat dari hasil tersebut maka dapat dinyatakan bahwa pemberian *Cetrorelix acetate* mempengaruhi terjadinya penurunan ekspresi reseptor estrogen pada uterus.

Penurunan ekspresi reseptor estrogen dapat terjadi karena estrogen yang berikatan dengan reseptornya ada dalam jumlah yang sedikit. Ikatan antara estrogen dan reseptornya terjadi di dalam nukleus, estrogen berikatan dengan ERs melalui domain E/F yang mengikat ligand domain (LBD). ERs yang terikat estrogen selanjutnya berikatan dengan *Estrogen Responsive Element* (EREs) genomik dalam bentuk dimerisasi melalui *DNA-binding domain* acentral (DBD) pada domain C, dan dengan demikian mengontrol transkripsi gen target untuk mengarahkan tindakan fisiologis tertentu (Inoue dan Inoue, 2004). Keadaan tidak adanya hormon estrogen pada uterus akan mengakibatkan reseptor estrogen bersifat inaktif (Fitrianingtyas, 2016). Reseptor estrogen yang tidak berikatan

dengan estrogen akan berada dalam keadaan inaktif, dimana ERs akan berikatan dengan *heat shock protein* dalam inti sel target (McDonnel dan Norris, 2002).

Estrogen merupakan hormon steroid yang dihasilkan oleh sel teka interna dan sel granulosa pada folikel ovarium. Estrogen bekerja dengan memodulasi sekresi LH dan FSH dan berperan sebagai kontrol umpan balik negatif dengan menurunkan sekresi LH dan FSH, atau sebagai kontrol umpan balik positif dengan menstimulasi sekresi LH dan FSH (Rejeki *et al.*, 2017).

Follicle Stimulating Hormone (FSH) berperan dalam folikulogenesis dimana FSH merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel hingga menjadi folikel de Graaf yang akan mensekresikan estrogen dalam jumlah yang cukup banyak untuk menimbulkan gejala-gejala birahi. *Luteinizing Hormone* (LH) bekerjasama dengan FSH untuk merangsang pematangan folikel dan menyebabkan ovulasi. Saat folikel matang dan kadar estrogen tinggi, maka kadar LH akan mencapai puncaknya untuk memicu pematangan sel telur dan pemecahan dinding folikel yang disebut dengan ovulasi (Sirojudin, 2000).

Cetrorelix acetate termasuk dalam golongan obat yang bekerja sebagai GnRH antagonis. GnRH antagonis bekerja bersaing dengan GnRH yang dihasilkan tubuh dalam mengikat reseptor GnRH yang ada di hipofisa anterior. Ikatan GnRH dengan reseptornya menghasilkan sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang sangat berperan penting dalam proses folikulogenesis dan ovulasi (Coccia *et al.*, 2004). Pemberian *Cetrorelix acetate* terbukti mampu mempengaruhi proses folikulogenesis,

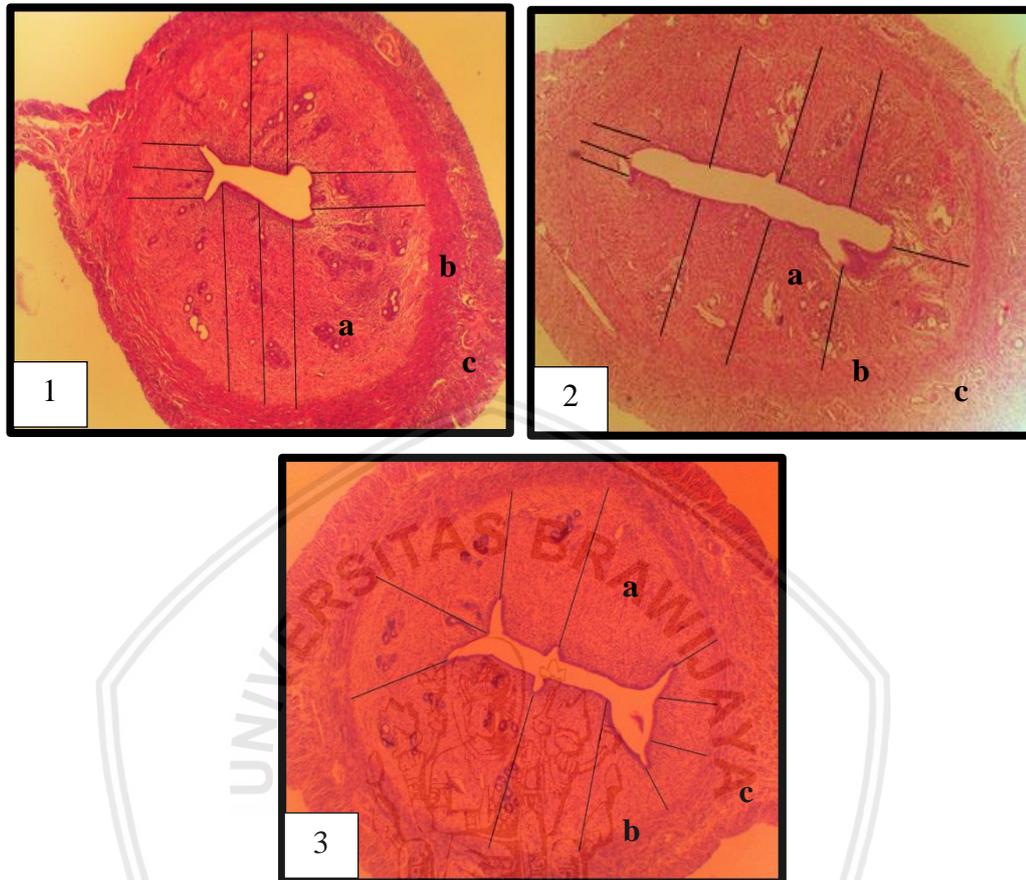
Hutabarat (2019) menyatakan bahwa dengan pemberian *Cetrorelix acetate* dengan dosis 0,009 mg / ekor dan 0,0135 mg / ekor dapat meningkatkan jumlah folikel primer dan sekunder namun terjadi penurunan folikel tersier dan menunjukkan peningkatan folikel atresia pada folikel antral. Adanya peningkatan folikel atresia dapat menandakan bahwa terjadi penurunan stimulasi hormon FSH oleh *Cetrorelix acetate* sehingga tidak terjadi pula ovulasi oleh hormon LH, yang mana peran keduanya sangat diperlukan dalam sekresi hormon estrogen.

Kerja GnRH yang terhambat dalam mengikat reseptornya akan menyebabkan sekresi hormon FSH dan LH oleh hipofisa anterior menurun dan mengakibatkan terganggunya proses folikulogenesis dan ovulasi. Mekanisme regulasi hormon yang tidak normal dapat menyebabkan terjadinya hipofungsi ovarium (Hafez dan Hafez, 2000). Hipofungsi ovarium adalah keadaan dimana ovarium mengalami penurunan fungsinya sehingga tidak terjadi perkembangan folikel maupun ovulasi. Hewan yang mengalami hipofungsi ovarium biasanya mengalami siklus ovulasi yang tertunda atau ovulasi lebih lama dibandingkan siklus normalnya (McKinnon *et al.*, 2011). Evaluasi hipofungsi ovarium juga dapat dilihat dari adanya sel-sel folikel yang gagal dalam menanggapi rangsangan hormonal, perubahan kuantitas maupun kualitas sekresi hormonal, terjadi penurunan rangsangan yang berkaitan erat dengan fungsi hipotalamus - pituitaria-ovarium yang akan menyebabkan menurunnya sekresi GnRH sehingga tidak ada aktivitas ovarium (Hafez dan Hafez, 2000).

5.2 Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Gambaran Histopatologi Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Uterus adalah salah satu organ reproduksi betina yang berfungsi sebagai penerima dan tempat perkembangan ovum yang telah dibuahi (Harlita *et al.*, 2015). Uterus termasuk dalam salah satu organ reproduksi yang dipengaruhi oleh kerja hormon estrogen. Jumlah estrogen dalam tubuh dapat memberikan efek luas pada organ dan jaringan khususnya pada organ reproduksi yakni ovarium, uterus, serviks, vulva dan vagina. Selama masa reproduksi estrogen berperan dalam membentuk ketebalan endometrium, menjaga kualitas dan kuantitas cairan serviks dan vagina sehingga sesuai untuk penetrasi sperma (Sloane, 2004).

Terdapat empat jenis uterus yang beragam pada setiap spesies mamalia yakni uterus dupleks, uterus bikornis, uterus bipartitis, dan uterus simpleks. Uterus pada tikus termasuk dalam tipe dupleks yang bercirikan mempunyai dua buah serviks, dua kornua yang terpisah, serta tidak memiliki korpus uteri (Amita, 2015). Uterus terdiri dari 3 lapisan yakni lapisan yang paling dalam endometrium, lapisan tengah myometrium dan perimetrium yang merupakan lapisan terluar. Lapisan endometrium adalah lapisan yang responsif terhadap perubahan hormon reproduksi sehingga perubahan lapisan endometrium bervariasi sepanjang siklus estrus dan dapat dijadikan indikator adanya penurunan maupun peningkatan hormon pada hewan tersebut (Mardiati dan Sitaswi, 2008).



Gambar 5.5 Hasil pengukuran tebal endometrium tikus putih (40x)

Keterangan: (1) Kontrol negatif
 (2) Kelompok P1 (*Cetrorelix acetate* 0,009 mg)
 (3) Kelompok P2 (*Cetrorelix acetate* 0,0135 mg)
 (a) Endometrium
 (b) Myometrium
 (c) Perimetrium

Hasil perhitungan rata-rata ketebalan endometrium hasil induksi GnRH antagonis *Cetrorelix acetate* adalah sebagai berikut, kelompok kontrol negatif adalah $457,52 \pm 68,7$, kelompok perlakuan P1 adalah $369,87 \pm 37,4$, dan kelompok perlakuan P2 adalah $261,39 \pm 30,5$. Tebal endometrium kelompok perlakuan P1 dan perlakuan P2 mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Rata-rata tebal endometrium kelompok kontrol negatif

senilai $457,52 \pm 68,7$, kelompok perlakuan P1 terdapat penurunan sebesar 19,1% menjadi $369,87 \pm 37,4$ dan kelompok perlakuan P2 $261,39 \pm 30,5$ dengan penurunan sebesar 42,8%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *Cetrorelix acetate* mempengaruhi tebal endometrium (**Gambar 5.5** dan **Tabel 5.3**).

Tabel 5.3 Pengaruh GnRH antagonis terhadap tebal endometrium tikus putih

Kelompok	Rata-rata tebal endometrium \pm SD	Rata-rata tebal endometrium	
		Peningkatan terhadap K-	Penurunan terhadap K-
K- (Kontrol negatif)	$457,52 \pm 68,7^c$	-	-
P1 (<i>Cetrorelix acetate</i> 0,009 mg/ekor)	$369,87 \pm 37,4^b$	-	19,1%
P2 (<i>Cetrorelix acetate</i> 0,0135 mg/ekor)	$261,39 \pm 30,5^a$	-	42,8%

Keterangan: Notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya

Tebal endometrium dapat mengalami penurunan pada kelompok perlakuan P1 dan P2 oleh karena adanya induksi GnRH antagonis yaitu *Cetrorelix acetate*. GnRH antagonis bekerja bersaing dengan GnRH pada tubuh dalam hal berikatan dengan reseptor GnRH, yang berakibat pada penekanan produksi FSH dan LH pada hipofisa anterior (Pinski *et al.*, 2018).

FSH dan LH bersama-sama bekerja dalam proses folikulogenesis dan ovulasi. FSH dan LH memberikan stimulasi pada pembentukan dan pematangan folikel pada proses folikulogenesis (Sutiyono *et al.*, 2008). Proses pembentukan dan pematangan folikel, dari folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier hingga menjadi folikel de Graaf nantinya akan menghasilkan hormon estrogen. Hormon estrogen ini dihasilkan oleh kedua lapisan folikel yaitu

lapisan sel terluar folikel yang merupakan sel theca, dan sel pada bagian dalam yakni sel-sel granulosa (Outang *et al.*, 2016).

GnRH antagonis yang diberikan yaitu *Cetrorelix acetate* terbukti bersaing dengan GnRH dalam tubuh dalam mensekresikan hormon FSH dan LH yang sangat berpengaruh pada proses folikulogenesis. Perkembangan folikel sangat dipengaruhi oleh FSH dimana dalam kelompok perlakuan *Cetrorelix acetate* P1 dengan dosis 0,009 mg / ekor dan P2 0,0135 mg/ekor terdapat perubahan abnormalitas berupa peningkatan folikel atresia dan nekrosis pada folikel antral di ovarium. Folikel atresia menjadi ciri bahwa menurunnya stimulasi hormon FSH sehingga tidak terjadi pula ovulasi dan kondisi histopatologi berupa nekrosis pada folikel ovarium merupakan salah satu ciri dari hipofungsi ovarium oleh malnutrisi. Degenerasi dan nekrosis folikel ovarium menandakan bahwa tidak terjadi perkembangan pada folikel ovarium (Hutabarat, 2019). Folikel ovarium berperan penting dalam menghasilkan hormon estrogen yang mana hormon estrogen inilah yang akan mempengaruhi perkembangan organ reproduksi termasuk uterus.

Hormon estrogen dapat memberikan efek pada organ dan jaringan target apabila pada organ dan jaringan tersebut memiliki reseptor estrogen (Udiyani, 2018). Ikatan antara estrogen dan reseptor estrogen inilah yang akan mempengaruhi sistem reproduksi betina, termasuk menyebabkan perubahan ukuran tebal endometrium pada uterus. Endometrium merupakan jaringan yang sangat responsif terhadap perubahan hormon estrogen yang berperan penting

untuk proliferasi (Puspitadewi dan Sunarno, 2007). Estrogen memiliki peran dalam meningkatkan ukuran dan jumlah sel di myometrium dan endometrium (Pasaribu *et al.*, 2018). Hormon estrogen bekerja dengan menstimulasi sel epitel dan proliferasi stroma endometrium sehingga terjadi peningkatan ketebalan endometrium (McDonnel dan Norris, 2002). Mostafa *et al.*, (2018) juga menyatakan bahwa proliferasi dan diferensiasi kelenjar endometrium dan stroma diatur oleh hormon estrogen.

Perubahan hormonal dalam suatu individu mencakup durasi satu periode siklus yang disebut siklus estrus. Siklus estrus pada tikus dibagi dalam 4 yakni fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Peran estrogen dan progesteron sangatlah signifikan pada siklus estrus ini (Westwood, 2008). Untuk mengetahui siklus estrus biasanya dilakukan pengamatan apusan vagina, dari apusan vagina tersebut dapat diamati dan ditentukan fase siklus estrus tikus dengan mengamati adanya dominasi sel epitel berinti, kornifikasi dan sel leukosit (Paccola, 2013). Perubahan gambaran histologis berbagai komponen dari saluran reproduksi betina juga dapat dipakai sebagai acuan untuk menentukan fase siklus estrus (Westwood, 2008).

Nekropsi pada tikus kelompok perlakuan kontrol negatif, P1 dengan dosis 0,009 mg / ekor dan P2 0,0135 mg/ekor dilakukan pada fase siklus metestrus dimana pada fase ini secara pengamatan apusan vagina ketiga kelompok menunjukkan hasil yang sama yakni adanya dominasi sel-sel tanduk dan sel-sel leukosit pada pengamatan ulas vagina (**Lampiran 9**). Pengamatan histologis

uterus pada tikus putih fase metestrus menunjukkan lumen yang kecil, sel epitel luminal mengalami nekrosis dan mitosis secara bersamaan serta lapisan endometrium mengalami penurunan ketebalan secara bertahap (Westwood, 2008).

Tebal endometrium kelompok perlakuan P1 dan perlakuan P2 mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Rata-rata tebal endometrium kelompok kontrol negatif senilai $457,52 \pm 68,7$, kelompok perlakuan P1 terdapat penurunan sebesar 19,1% menjadi $369,87 \pm 37,4$ dan kelompok perlakuan P2 $261,39 \pm 30,5$ dengan penurunan sebesar 42,8%. Pemberian GnRH antagonis dapat disimpulkan menyebabkan penurunan ketebalan endometrium jika dibandingkan dengan kontrol negatif hingga 42,8% pada kelompok perlakuan P2.

Ketebalan endometrium juga dapat dipengaruhi oleh turunnya konsentrasi estrogen dalam darah sehingga penebalan endometrium tidak terjadi dan kelenjar uterus berada dalam keadaan tidak mengeluarkan sekresi (Sitasiwi, 2009). Ketebalan dinding endometrium yang berkurang akan mengakibatkan gangguan pada implantasi zigot yang akan memperkecil kemungkinan terjadinya kehamilan (Dinastiti, 2016).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian GnRH antagonis mampu menurunkan ekspresi ER α hingga sebesar 45% dan menurunkan ekspresi ER β sebesar 75,7% dengan pemberian dosis pada tikus putih 0,0135 mg/ekor.
2. Pemberian GnRH antagonis menyebabkan endometrium lebih tipis setelah diberikan induksi hingga 42,8% dengan pemberian dosis pada tikus putih 0,0135 mg/ekor.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengamatan makroskopis maupun mikroskopis seluruh komponen penyusun uterus untuk mengetahui pengaruh signifikan dari pemberian GnRH antagonis yakni *Cetrorelix acetate* terhadap uterus tikus putih, serta perlu dilakukan penelitian untuk pengembangan hewan model hipofungsi ovarium dengan perlakuan yang berbeda agar didapat pendekatan model hipofungsi ovarium yang paling tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Amita, Hesty. 2015. Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica L.*) dan Beluntas (*Pluchea indica L.*) terhadap Gambaran Histologi Uterus dan Oviduk Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Betina. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Asren, A.F. 2015. Anestrus Sapi Perah dan Penanggulangannya (Studi Kasus di Balai Besar Pembibitan Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak Baturraden, Purwokerto - Jawa Tengah). Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Beckers T, Reilander H, Hilgard P. Characterization of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogs Based on a Sensitive Cellular Luciferase Reporter Gene Assay. *Anal Biochem* 1997;251:17–23.
- Bouchard, Philippe., Fauser, Bart. 2000. Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist: New Tools vs. Old Habits. *Journal Fertility And Sterility* Vol. 73, No. 1,
- Cavalcanto, Todd D. 2007. Hormone Regulated Inflammatory of the Immature Rat Uterus in Response To Leukocyte Infiltration and MMP activation. *Journal of ProQuest*.
- Coccia, Maria E., Comparetto, Ciro., Bracco, Gian L., Scarselli, Gianfranco. 2004. GnRH Antagonists. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115S (2004) S44–S56
- Desfariza, Chintya. 2016. Studi Imunohistokimia Perkembangan Reseptor Estrogen Alpha (ER) pada Ovarium dan Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Banda Aceh: Universitas Syiah Kuala
- Dinastiti, Vide Bahtera. 2016. Pengaruh Pemberian Susu Kedelai Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen-B Uterus Dan Ketebalan Endometrium Pada Masa Reproduksi Tikus Betina (*Rattus norvegicus*). Thesis. Malang: Universitas Brawijaya
- Fitrianiingtyas, Rizki. 2016. Pengaruh Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) Terhadap Ekspresi Estrogen Receptor-A (ER-A) dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Depo Medroksi Progesteron. Thesis. Malang: Universitas Brawijaya

- Guyton AC, Hall EJ. 2006. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.. Setiawan I., Tengadi KA, Santoso A, Penerjemah; Setiawan I, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari Textbook of Medical Physiology. Edisi ke-9.
- Hafez ESE , Hafez B. 2000. Anatomy of Male Reproduction . In Reproduction in Farm Animals . Edisi - 7. Lippincott William & Wilkins. A Wolter Kluwer Company
- Harlita, Probosari, Riezky M., Ariyanto, Joko. 2015. Perubahan Histologis Uterus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar: Aktifitas Antifertilitas Ekstrak Kulit Biji Mete (*Anacardium occidentale L.*). Jurnal BIOEDUKASI Volume 8, Nomor 2 Halaman 1-4
- Hermadi, H. A. 2015. Pidato. *Pemberantasan Kasus Kemajiran pada Ternak Menuju Kemandirian di Bidang Kesehatan Reproduksi Hewan dan Ketahanan Pangan di Indonesia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Hikmah, Exma M. 2014. Pengaruh Ekstrak Air Daun Katu (*Sauropus androgynus (L.) Merr.*) terhadap Berat Uterus dan Tebal Endometrium Mencit (*Mus musculus L.*) Premenopause. Skripsi. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Hiroi, H., S. Inoue, T. Watanabe, W. Goto, A. Orimo, M. Momoeda, O. Tsutsumi, Y. Taketani, and M. Muramatsu. 1999. Differential Immunolocalization Of Estrogen Receptor A and B In Rat Ovary and Uterus. *J. Mol. Endocrinol.* 22: 37-44.
- Mostafa AM, Elsaid N, Fawzy RA, Elfeky A. 2018. Endometrial Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Women with Abnormal Uterine Bleeding in the Reproductive Age. *Int J Reprod Med Gynecol.* 2018;4(2): 041-046.
- Hutabarat, Mitra Artha Kurnia. 2019. Pengaruh GnRH Antagonis terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen (ERs) dan Perubahan Histopatologi Ovarium pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang
- Inoue, Satoshi., Inoue, Kuniko Horie. 2004. Estrogen Receptor Function and Molecular Mechanisms. *JMAJ* 47(10): 480–485.
- Jacob, T.Z., Baziad, A. 1994. Endokrinologi Reproduksi, 1st Ed. Jakarta: KSERI

- Jondriatno D. 2012. Efektivitas Pemberian Ekstrak Etanol Purwoceng (*Pimpinella alpina*) Pada Hari 1 -13 Kebuntingan Terhadap Keberhasilan Implantasi Pada Tikus Putih (*Rattus sp.*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kusumawati D. 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba . Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- [LPPM] Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat. 2015. Buku Panduan Sekolah Peternakan Rakyat (SPR 1111). Bogor: IPB
- Lund, Julie Davey Dalsgaard. 2005. The Estrogen Receptor. Denmark: University of Aarhus
- Macmillan KL dan Burke AJ. 1996. Superovulatory Doses Of Pregnant Mare Serum Gonadotropin Cause Delayed Implantation and Infertility In Immature Rats. *Bio. Reprod.* 25 : 253-260.
- Malole, M. B. M. dan C. S. Pramono. 1989. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mardiati, Siti Muflichatun., Sitasiwi, Agung Janika. 2008. Korelasi Jumlah Folikel Ovarium dengan Konsentrasi Hormon Estrogen Mencit (*Mus musculus*) setelah Konsumsi Harian Tepung Kedelai selama 40 Hari. *Buletin Anatomi dan Fisiologi* Volume XVI, Nomor 2, Oktober 2008
- McDonnell, D.P. & Norris, J.D., 2002. Connections and Regulation of the Human Estrogen Receptor. *Mapping Cellular Signaling.* 269: 1642-1643
- McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. 2011. Equine Reproduction. 2nd ed. Iowa (US): Blackwell Scientific.
- Murray, R.K., D.K. Granner, dan V.W. Rodwel. 2009. Biokimia Harper. Edisi ke-27. (Diterjemahkan oleh: Brahman U). EGC, Jakarta.
- Olive, David L., Palter, Steven F. Reproductive Physiology. Editors: Berek, Jonathan S. Title: Berek & Novak's Gynecology, 14th Edition Copyright ©2007 Lippincott Williams & Wilkins. Hal: 252-258.
- Outang, T.M.T., Nalley, Wilmientje M., Hine, Thomas M. 2016. Pemanfaatan Ekstrak Hipofisis Sapi untuk Memperbaiki Performans Reproduksi Induk Babi Post Partum. *Jurnal Veteriner* September 2017 Vol. 18 No. 3 : 383-392

- Paccola, C.C. 2013 . The Rat Estrous Cycle Revisited: A Quantitative And Qualitative Analysis. Anim. Reprod Vol.10 No.4
- Pasaribu, Irma Hamdayani. 2017. Pengaruh Ekstrak Teh Hijau Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen-A Dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus Yang Dipapar Monosodium Glutamat. Thesis. Malang : Universitas Brawijaya.
- Pinski, J., Najib L., Gabor H., Kate G., Andreas J., Manuel V., Sham S. K., Andrew V. S. 1996. Chronic Administration of the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Antagonist Cetrorelix Decreases Gonadotrope Responsiveness and Pituitary LHRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels in Rats. *Endocrinology* Vol. 137 (8) : 3430-3436.
- Prasetyo, Dimas. 2016. Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Setelah Pemberian Infusa Buah Adas (*Foeniculum vulgare Mill*). Skripsi . Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Pratoko, D.K. 2012. Molecular Docking Turunan Kalkon Terhadap Reseptor Estrogen β (ER- β sebagai Antikanker Payudara. J. Kim. 1(1): 1-10.
- Prihandini, P.W., D. Pamungkas, and D.B. Widodo. 2005. Kemampuan mengelola usaha peternak dalam usaha ternak sapi potong (Studi kasus di Lemahbang Kecamatan Jepon, Blora). Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner hal. 292–298.
- Puspitadewi, Sinthia dan Sunarno. 2007. Potensi Agensia Anti Fertilitas Biji Tanaman Jarak (*Jatropha curcas*) dalam Mempengaruhi Profil Uterus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. *Jurnal Sains & Matematika (JSM) Volume 15, Nomor 2, April 2007, Hal. 55 – 60.*
- Rejeki, R., Harjana, T. Sukiya. 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Kenari (*Canarium indicum, L.*) Terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus, L.*). Jurnal Prodi Biologi Vol.6 No.3
- Rodney, J. Y. H. 2013. *Biotechnology and Biopharmaceuticals. Second edition.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Sirojudin, D. 2000. Teknik Masage Ovari dan Penggunaan Potahormon pada Kasus Hipofungsi Ovarium Sapi Perah di Kabupaten Bogor. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Sitasiwi, Agung J. 2009. Hubungan Kadar Hormon Estradiol 17- β dan Tebal Endometrium Uterus Mencit (*Mus musculus L.*) selama Satu Siklus Estrus. Semarang: Universitas Diponegoro

- Sloane, Ethel. 2004. *Anatomy and Physiology: An Easy Learner*.
Diterjemahkan oleh: James Veldman, EGC, Jakarta.
- Speroff, L., Fritz, M.A. 2005. *Female Infertility in : Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*. Seventh Edition, PA : Lippincott Williams and Wilkins. Edisi 6. hal 52-66
- Sutiyono, Daud S., Alam S. 2017. Identifikasi Gangguan Reproduksi Sapi Betina di Peternakan Rakyat. *Jurnal Veteriner* Vol.18 No.4: 580-588.
- Udiyani, D. 2018. Ekstrak Etanol Umbi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L) Meningkatkan Ketebalan Myometrium dan Jumlah Kelenjar Endometrium Uterus pada Tikus Betina yang Di ovariektomi. Denpasar: Universitas Udayana
- Wada-Hiraike, Osamu and Hiraike, Haruko and Okinaga, Hiroko and Imamov, Otabek and Barros, Rodrigo and Morani, Andrea and Omoto, Yoko and Warner, Margaret and Gustafsson, Jan-Ake. 2006. Role of Estrogen Receptor β in Uterine Stroma and Epithelium: Insights From Estrogen Receptor β -/- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103. 18350-5. 10.1073/pnas.0608861103.
- Wahyuni, Sri., Desfariza, Chintya., Hamny, Akmal, Muslim., Gholib, Armansyah, T. 2009. An Immunohistochemical Study of Alpha Estrogen Receptor ($ER\alpha$) Development in Ovary and Uterus of Rat (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Medika Veterinaria* Februari 2019, 13 (1):15-21
- Wang, H., H. Eriksson, L. Sahlin. 2000. Estrogen Receptors α dan β in the Female Reproductive Tract Of The Rat During The Estrous Cycle. *Biol. Reprod.* 63: 1331-1340
- Weihua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E., Warner, M.m Gustafsson, J. 2000. Estrogen Receptor (ER) β , A Modulator of $ER\alpha$ In The Uterus. *Journal PINAS* Vol.97 No.11
- Westwood, F. Russell. 2008. *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical. Toxicologic Pathology*, 36: 375-384
- Widyaningrum, Ratih. 2014. Usulan Desain Ulang Sistem Peternakan Sapi dengan Menggunakan Pendekatan Ergonomi Makro. Thesis. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Yatim, Wildan.1994. *Reproduksi dan Embriologi*. Bandung: Tarsito

LAMPIRAN



Lampiran 1. Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1011-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : EKSPRESI TGF- β DAN PROFIL FOLIKULOGENESIS
PADA TIKUS MODEL HYPOFUNGSI OVARIUM

PENELITI : AULIA FIRMAWATI

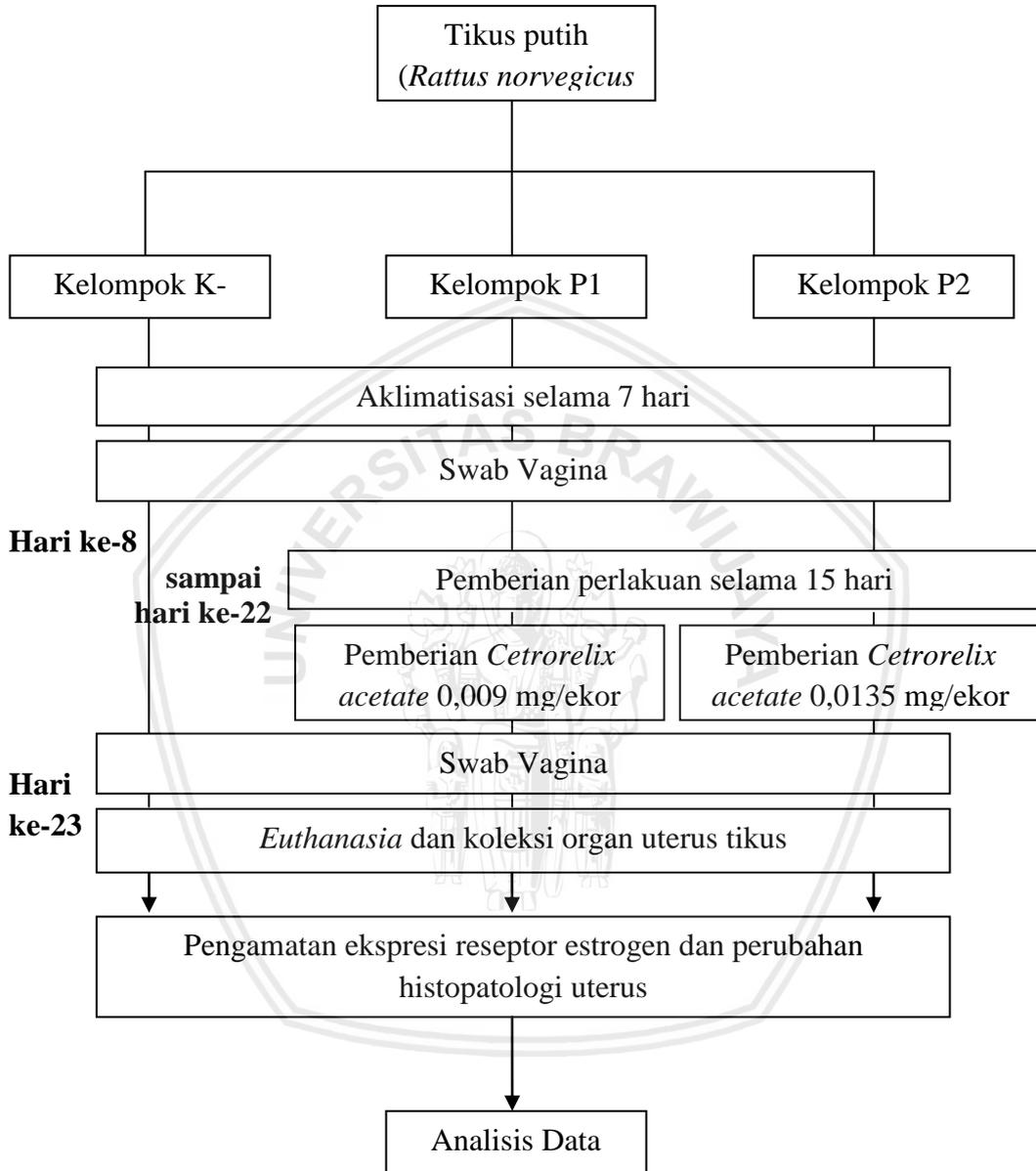
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 7 September 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. H. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Kerangka Operasional

Lampiran 3. Perhitungan Dosis Konversi dari Dosis pada Manusia ke Tikus

Diketahui: dosis ganda *Cetorelix acetate* pada manusia = 0,25 mg/mL

konversi dosis manusia 1 mg = 0,018 mg pada tikus

$$0,25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 0,018 \text{ mg} = 0,0045 \text{ mg}$$

Didapatkan hasil perhitungan dosis ganda pada manusia 0,25 mg/mL setara dengan 0,0045 mg pada tikus, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penelitian mengamati pengaruh pada tikus dengan dosis baru yakni 0,009 mg/ekor dan 0,0135 mg/ekor.

Volume injeksi :

Jika dosis ganda diencerkan menjadi 10 mL maka :

$$\text{Manusia} : \frac{0,25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 0,025 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Tikus} : 0,0045 \text{ mg} \times 10 = 0,045 \text{ mg} \rightarrow 0,05 \text{ mg (dibulatkan)}$$

$$\text{Jika } \frac{0,25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \frac{0,05 \text{ mg}}{x \text{ mL}} \longrightarrow 0,25 \text{ mg} \cdot x = 0,05 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}$$

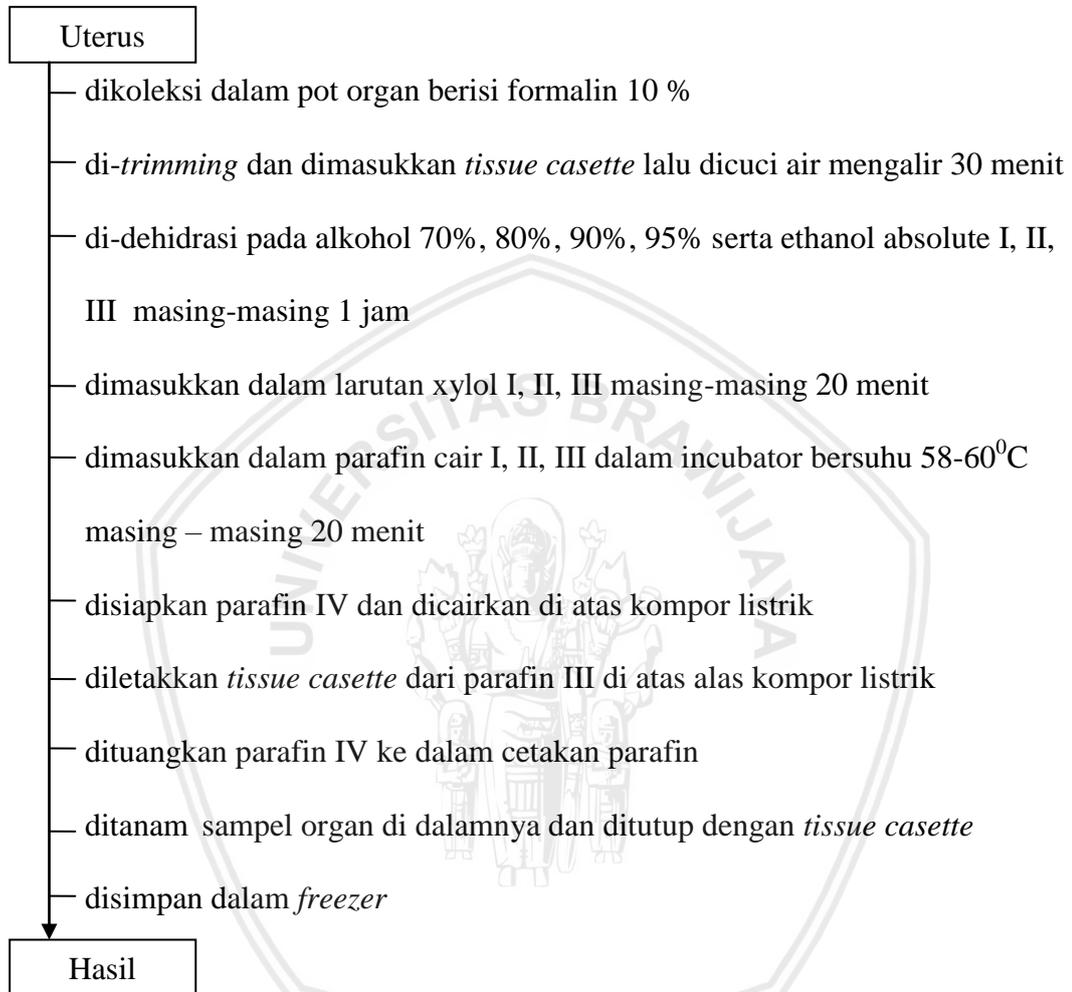
$$0,25 \text{ mg} \cdot x = 0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}$$

$$x = \frac{0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}}{0,25 \text{ mg}} = 2 \text{ mL}$$

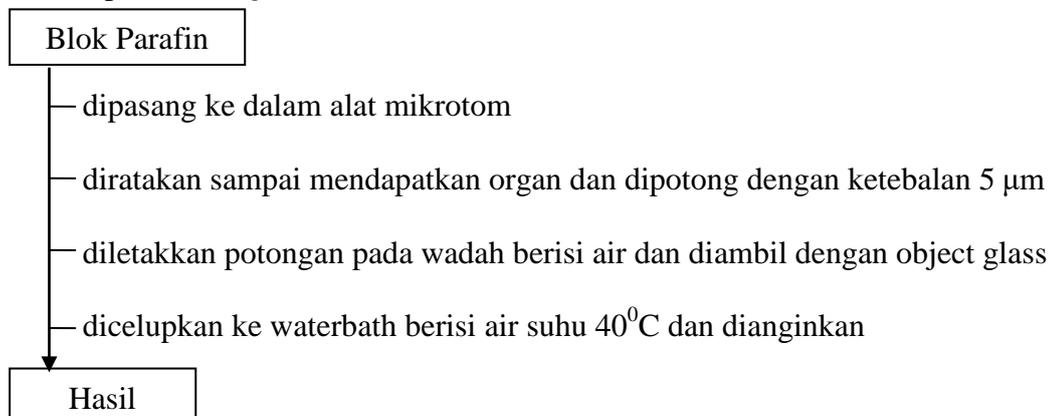
Jika dosis ganda *Cetorelix acetate* untuk tikus dalam pengenceran 10 mL didapatkan pada pemberian 2 mL maka dari pengenceran 1 mL pemberian yang diperlukan menjadi 0,2 mL/ ekor tikus. Dosis dalam penelitian akan menggunakan dosis baru menurut pengenceran diatas maka volume yang akan diinjeksikan sebesar 0,4 mL/ekor dan 0,6 mL/ ekor dalam pengenceran 1 mL.

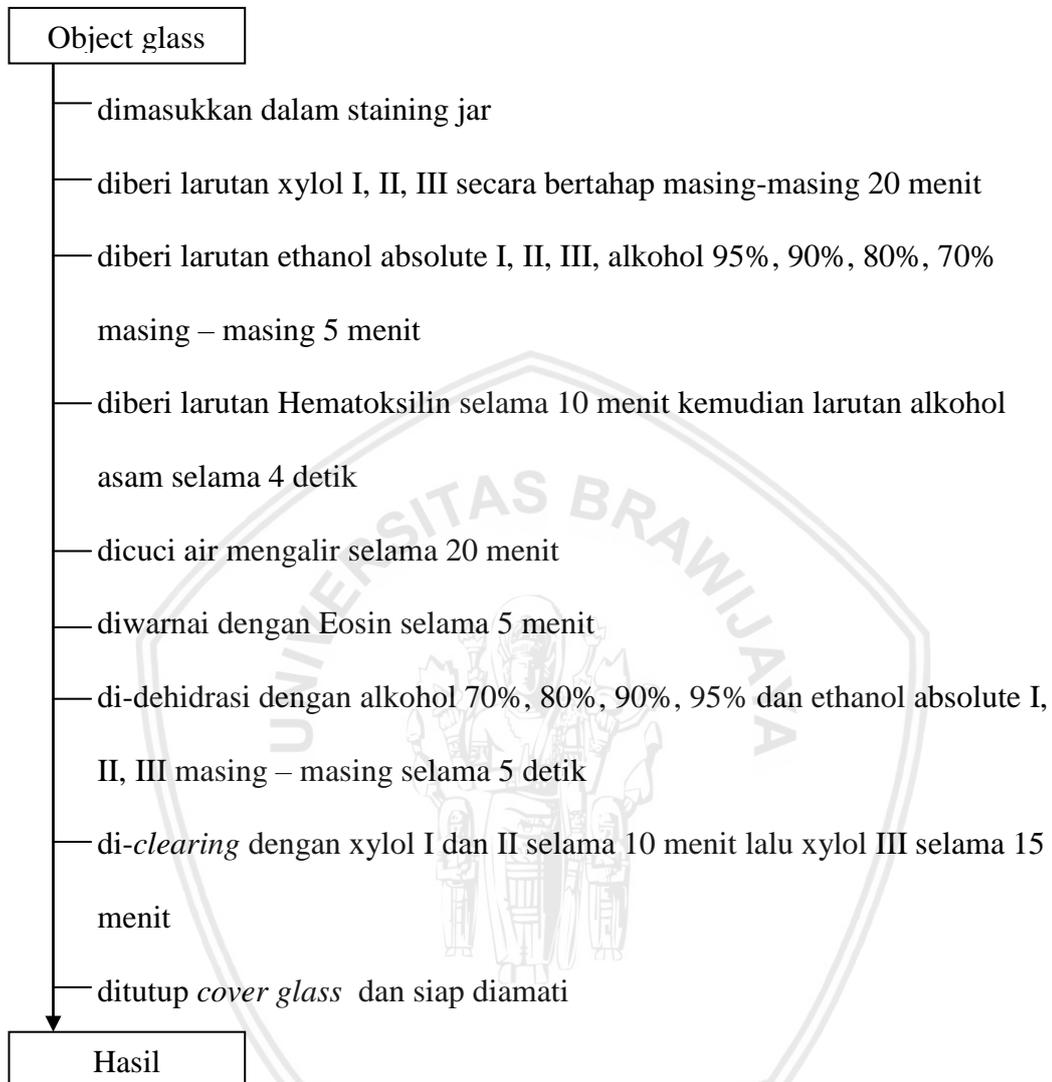
Lampiran 4. Tahapan Alur Pembuatan Preparat Histopatologi Uterus (HE)

a. Tahap Fiksasi – Dehidrasi – *Clearing* – *Infiltrasi Parafin* – *Embedding*



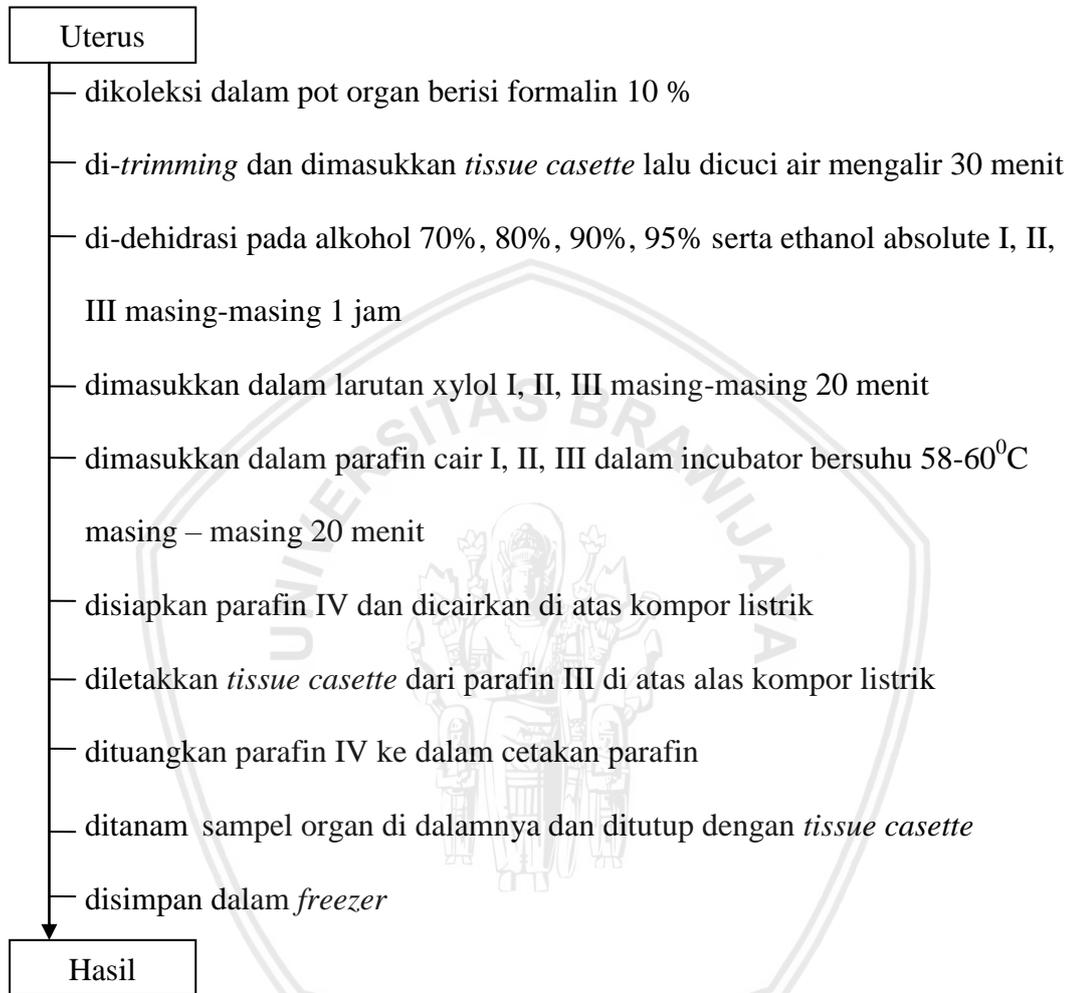
b. Tahap *Sectioning*



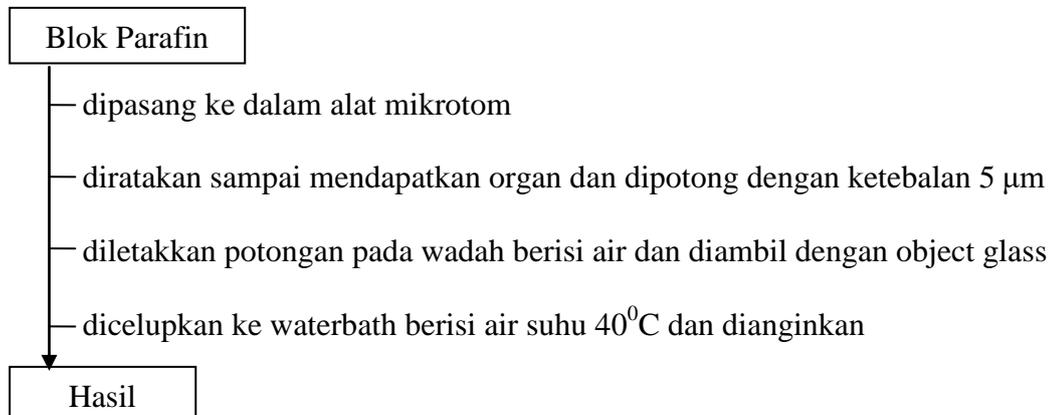
c. Tahap *Staining* HE

Lampiran 5. Tahapan Alur Pembuatan Preparat Imunohistokimia

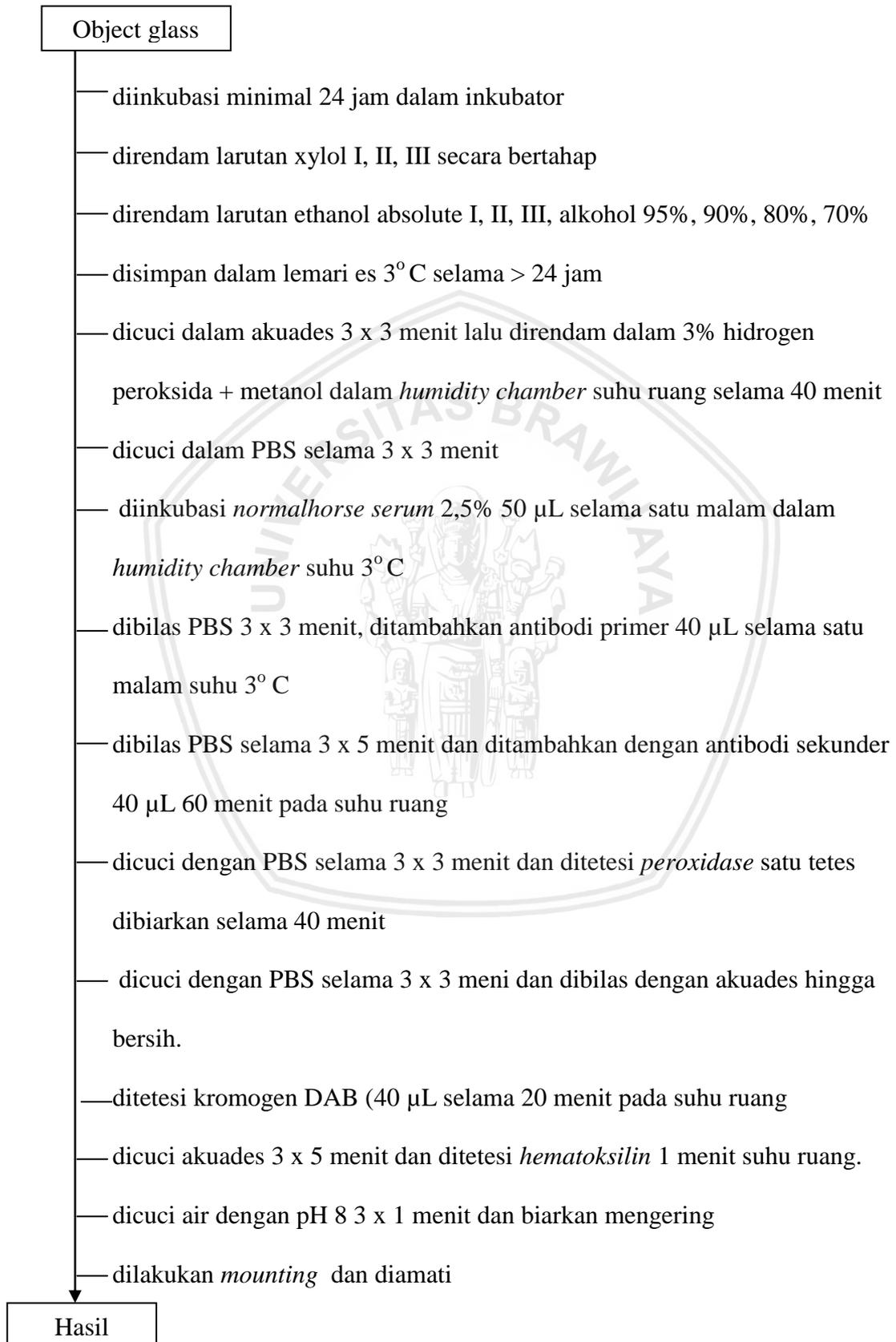
a. Tahap Fiksasi – *Dehidrasi* – *Clearing* – *Infiltrasi Parafin* – *Embedding*



b. Tahap *Sectioning*



c. Tahap Pewarnaan IHK



Lampiran 6. Hasil Statistika Ekspresi ER α

Tabel 6.1 Tes Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ER A	.173	18	.160	.967	18	.743

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 6.2 Tes Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ER A

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.858	2	15	.444

Tabel 6.3 Tabel Deskriptif

Descriptives

ER A

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	46.2833	7.75834	3.16733	38.1415	54.4252	36.04	57.54
P1	6	34.3567	1.97178	.80497	32.2874	36.4259	30.78	36.56
P2	6	25.1500	6.78019	2.76800	18.0346	32.2654	15.46	32.20
Total	18	35.2633	10.56494	2.49018	30.0095	40.5172	15.46	57.54

Tabel 6.4 Uji ANOVA

ANOVA

ER A

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1347.252	2	673.626	18.363	.000
Within Groups	550.254	15	36.684		
Total	1897.506	17			

Tabel 6.5 Uji BNJ**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: ER A

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	11.9267*	3.49684	.010	2.8437	21.0096
	P2	21.1333*	3.49684	.000	12.0504	30.2163
P1	Kontrol	-11.9267*	3.49684	.010	-21.0096	-2.8437
	P2	9.2067*	3.49684	.047	.1237	18.2896
P2	Kontrol	-21.1333*	3.49684	.000	-30.2163	-12.0504
	P1	-9.2067*	3.49684	.047	-18.2896	-.1237

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

ER ATukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P2	6	25.1500		
P1	6		34.3567	
Kontrol	6			46.2833
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 7. Hasil Statistika Ekspresi ER β

Tabel 7.1 Tes Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ER B	.115	18	.200*	.921	18	.137

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 7.2 Tes Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ER B

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.074	2	15	.076

Tabel 7.3 Tabel Deskriptif

Descriptives

ER B

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	20.1867	1.64042	.66970	18.4651	21.9082	17.88	21.76
P1	6	13.8150	2.30215	.93985	11.3990	16.2310	10.52	16.08
P2	6	4.9067	3.76433	1.53678	.9562	8.8571	1.38	10.04
Total	18	12.9694	6.93531	1.63467	9.5206	16.4183	1.38	21.76

Tabel 7.4 Uji ANOVA

ANOVA

ER B

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	706.870	2	353.435	47.845	.000
Within Groups	110.805	15	7.387		
Total	817.675	17			

Tabel 7.5 Uji BNJ**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: ER B

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	6.3717*	1.56919	.003	2.2958	10.4476
	P2	15.2800*	1.56919	.000	11.2041	19.3559
P1	Kontrol	-6.3717*	1.56919	.003	-10.4476	-2.2958
	P2	8.9083*	1.56919	.000	4.8324	12.9842
P2	Kontrol	-15.2800*	1.56919	.000	-19.3559	-11.2041
	P1	-8.9083*	1.56919	.000	-12.9842	-4.8324

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

ER BTukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P2	6	4.9067		
P1	6		13.8150	
Kontrol	6			20.1867
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 8. Hasil Statistika Tebal Endometrium

Tabel 8.1 Tes Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Tebal Endometrium	.111	18	.200*	.951	18	.441

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 8.2 Tes Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Tebal Endometrium

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.104	2	15	.157

Tabel 8.3 Tabel Deskriptif

Descriptives

Tebal Endometrium

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	6	457.5267	68.76041	28.07132	385.3670	529.6863	370.44	536.66
P1	6	369.8783	37.46820	15.29633	330.5579	409.1988	323.97	431.66
P2	6	261.3983	30.50744	12.45461	229.3827	293.4139	231.78	303.79
Total	18	362.9344	94.29171	22.22477	316.0443	409.8246	231.78	536.66

Tabel 8.4 Uji ANOVA

ANOVA

Tebal Endometrium

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	115832.9	2	57916.464	24.601	.000
Within Groups	35312.822	15	2354.188		
Total	151145.7	17			

Tabel 8.5 Uji BNJ**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Tebal Endometrium

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P1	87.6483*	28.01302	.018	14.8853	160.4113
	P2	196.1283*	28.01302	.000	123.3653	268.8913
P1	Kontrol	-87.6483*	28.01302	.018	-160.4113	-14.8853
	P2	108.4800*	28.01302	.004	35.7170	181.2430
P2	Kontrol	-196.1283*	28.01302	.000	-268.8913	-123.3653
	P1	-108.4800*	28.01302	.004	-181.2430	-35.7170

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

Tebal EndometriumTukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
P2	6	261.3983		
P1	6		369.8783	
Kontrol	6			457.5267
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabel 8.6 Uji Korelasi**Correlations**

		Tebal Endometrium
ER A	Pearson Correlation	.756**
	Sig. (2-tailed)	.000
	N	18
ER B	Pearson Correlation	.810**
	Sig. (2-tailed)	.000
	N	18

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

Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian

a. Dokumentasi Kegiatan



Swab Vagina



Pewarnaan dengan Giemsa

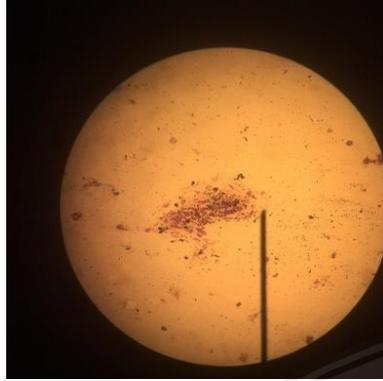


Injeksi GnRH-a via SC abdominal

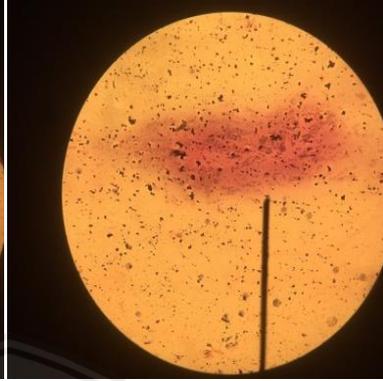


Pewarnaan IHK

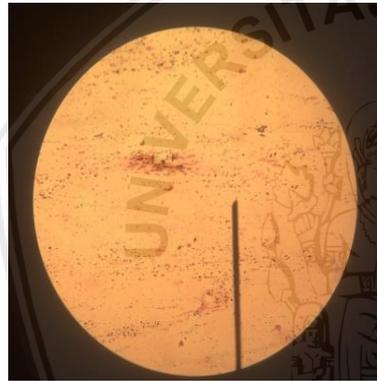
b. Hasil Swab Akhir Kontrol Negatif – Metestrus



KN-1



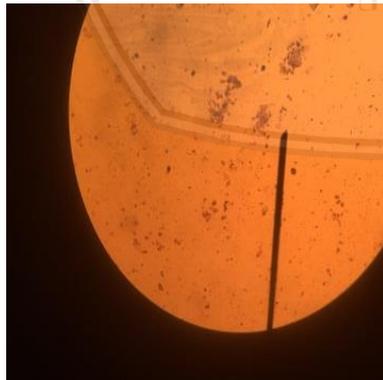
KN-2



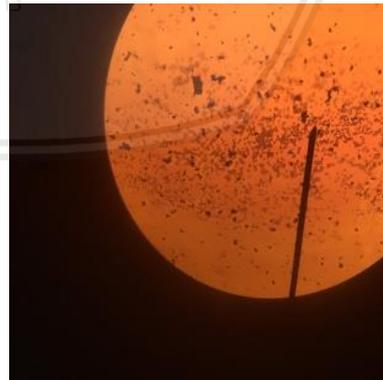
KN-3



KN-4



KN-5



KN-6

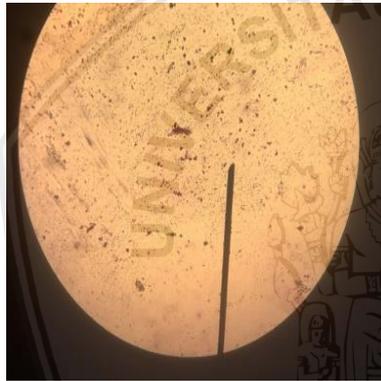
c. Hasil Swab Akhir Perlakuan 1 – Metestrus



P1-1



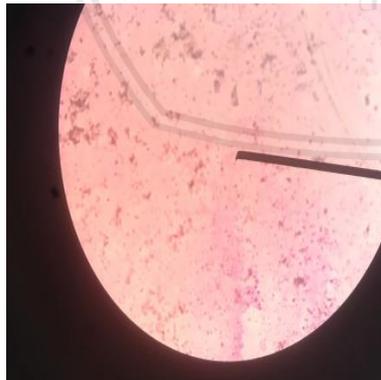
P1-2



P1-3



P1-4

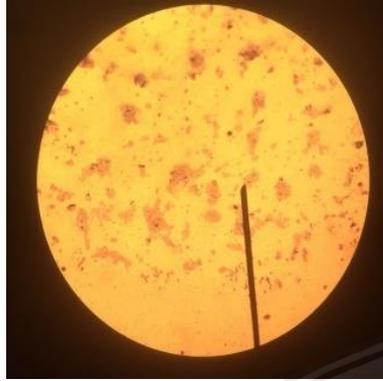


P1-5

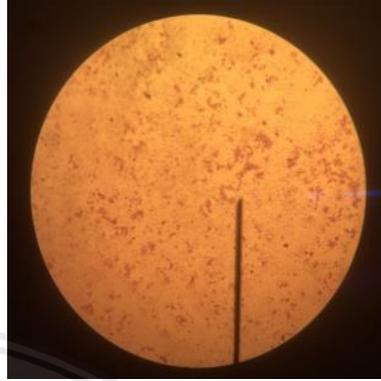


P1-6

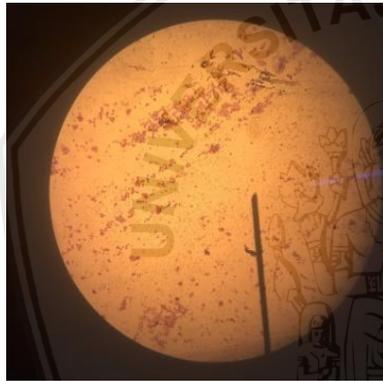
d. Hasil Swab Akhir Perlakuan 2 – Metestrus



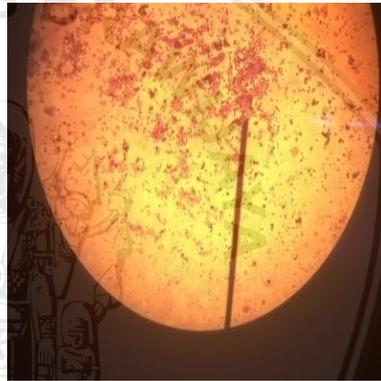
P2-1



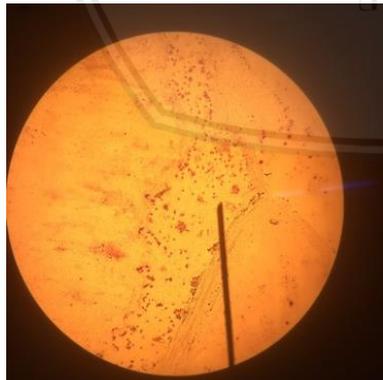
P2-2



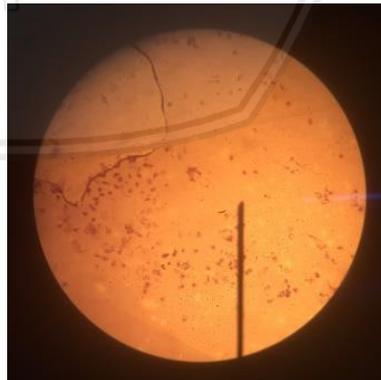
P2-3



P2-4



P2-5



P2-6