

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BIT MERAH
(*Beta vulgaris L.*) TERHADAP EKSPRESI VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) DAN
JUMLAH ARTERIOLE ENDOMETRIUM
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :
ZULFA HANUM
166070400111008**

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



TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL BIT MERAH (*Beta vulgaris L.*) TERHADAP EKSPRESI VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) DAN JUMLAH ARTERIOLE ENDOMETRIUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR ASAP ROKOK

OLEH :
ZULFA HANUM
166070400111008

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal : 23 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING


Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK
NIP. 195603311988022001
Ketua


Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS
NIK. 171152694
Anggota

Malang, 31 JUL 2018
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,




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

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BIT MERAH
(*Beta vulgaris L.*) TERHADAP EKSPRESI VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) DAN
JUMLAH ARTERIOLE ENDOMETRIUM
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG
DIPAPAR ASAP ROKOK**

**OLEH :
ZULFA HANUM
166070400111008**

**Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal : 23 Juli 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat**

KOMISI PENGUJI



**Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK
NIP. 195603311988022001
Ketua**



**Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS
NIK. 171152694
Anggota Penguji**



**Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 195505121987012001
Anggota Penguji**



**Dr.rer.nat Tri Yudianto, M.App.Sc
NIP. 196511051993032001
Anggota Penguji**

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

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

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

Malang, 23 Juli 2018

Mahasiswa,



Nama : Zulfa Hanum
NIM : 166070400111008
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran



HALAMAN PERUNTUKAN



Karya ilmiah ini kutujukan kepada

Ayahanda tercinta Dahlan, SE dan Ibunda tercinta Rosdiana,

Ketiga adik saya dr. Mulya, dr. Oriza Sativa, Farhan Dahlan

dan suamiku tersayang Novanda, S.Pd

RINGKASAN

Zulfa Hanum

Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing : Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, SpPK; Anggota Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS

Paparan asap rokok sering terjadi dikalangan masyarakat, ini dapat menyebabkan terjadinya peningkatan ROS sehingga antioksidan dalam tubuh menurun. ROS yang meningkat akan menyebabkan gangguan pada organ reproduksi seperti endometrium dan ovarium. Akibat gangguan ini maka akan berpengaruh pada tingkat kesuburan (infertilitas) pada wanita. Bit merah mengandung senyawa betalain yang tinggi akan antioksidan yang dapat menetralsir ROS yang ada didalam tubuh yang dapat mengganggu organ reproduksi wanita yang dapat menyebabkan salah penyebab ketidaksuburan pada wanita.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan berbagai dosis terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Jenis penelitian ini adalah *true experiments* dengan rancangan *post test only control group design*. Menggunakan 25 ekor tikus betina yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok kontrol positif (tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari) selama 56 hari, kelompok perlakuan I (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari) selama 56 hari, perlakuan II (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari) selama 56 hari dan perlakuan III (dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari) selama 56 hari. Metode yang digunakan untuk melihat ekspresi VEGF menggunakan *Immunohistochemistry* (IHC) dan pewarnaan *Haematoksin Eosin* untuk melihat jumlah arteriole pada endometrium tikus. Kemudian masing-masing slide diamati dibawah mikroskop Manual Dot Slide Olympus XC 10 yang dilihat per lapang pandang.

Data dianalisis dengan menggunakan *One Way Anova*, hasil nilai *p-value* VEGF ($p=0.000$), nilai *p-value* jumlah arteriole ($p=0.000$). Hasil penelitian membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.

Kesimpulan pada penelitian ini adalah terjadi peningkatan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole terjadi peningkatan pada kelompok yang diberi ekstrak etanol bit merah dengan berbagai dosis. Tetapi dosis ekstrak etanol bit merah yang dianggap paling cepat meningkatkan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole adalah kelompok perlakuan III dengan dosis 500 mg/kgBB/hari.

SUMMARY

Zulfa Hanum

Effect of Red Bit Ethanol Extract (*Beta vulgaris L.*) on Endothelial Growth Factor Vascular Expression (VEGF) And Number Of Endometrial Arteriole In Mice (*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke. Midwifery Master's Program Faculty of Medicine Universitas Brawijaya. Chair of Supervising Commission : Prof. DR. Dr. Kusworini Handono, M.Kes, SpPK; Member of Dr. dr. Endang Sriwahyuni, MS.

Exposure to cigarette smoke often occurs among people, this can lead to an increase in ROS so that the antioxidants in the body decreases. Increased ROS will cause disturbances in the reproductive organs such as the endometrium and ovaries. As a result of this disorder it will affect fertility (infertility) in women. Red bits contain high betalain compounds of antioxidants that can neutralize ROS in the body that can interfere with female reproductive organs that can cause one of the causes of infertility in women.

This study aims to determine the effect of red beet ethanol extract (*Beta vulgaris L.*) with various doses of VEGF expression and the amount of arteriole in the endometrium of mice exposed to cigarette smoke. This type of research is true experiments with post test design only control group design. Using 25 female rats divided into 5 groups: negative control group (without treatment), positive control group (mice exposed to cigarette 2 sticks/day) for 56 days, treatment group I (exposed to second cigarette smoke/day) extract of ethanol red beet with dose 125 mg/kgBW/day) for 56 days, treatment II (exposed to second cigarette smoke/day and given the extract of ethanol red beet with dose 250 mg/kgBW/day) for 56 days and treatment III (exposed cigarette smoke 2 cigarettes/day and given the extract of ethanol red beet with dose 500 mg/kgBW/day) for 56 days. The method used to view VEGF expression using Immunohistochemistry (IHC) and Haematoxylin Eosin staining to see the amount of arteriole in rat endometrium. Then each slide is observed under the Manual Dot Slide Olympus XC 10 microscope viewed per field of view.

Data were analyzed using One Way Anova, result of *p-value* VEGF value ($p=0.000$), *p-value* value of arteriole ($p=0.000$). The results showed that administration of red beet ethanol extract with dose of 500 mg/kgBW/day increased the expression of VEGF and the amount of arteriole in the endometrium of mice exposed to cigarette smoke. This study proves that giving of red beet ethanol extract can increase VEGF expression and amount of arteriole in endometrium of mouse exposed to cigarette smoke.

Conclusions in this study were VEGF expression and the number of arterioles was increased in the group given the extract of red beet ethanol with various doses. However, the dosage of the most rapidly increasing red ethanol extract increases the VEGF expression and the number of arterioles is the treatment group III with a dose of 500 mg/kgBW/day.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* dan Jumlah Arteriole Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok”**.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS. Selaku Rektor Universitas Brawijaya beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang Periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajaran yang telah memberikan izin, fasilitas dan berbagai kebijakan selama menempuh pembelajaran di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K), selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang beserta

segenap staf yang telah memberikan bantuan, perhatian dan motivasi selama pembelajaran hingga penyusunan tesis ini.

5. Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., SpPK, selaku pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama penyusunan tesis ini.

6. Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS, selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama penyusunan tesis ini.

7. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes, selaku penguji I yang telah memberikan arahan dan masukan demi kesempurnaan tesis ini.

8. Dr. rer. Nat Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc, selaku penguji II yang telah memberikan arahan dan masukan demi kesempurnaan tesis ini.

9. Dr. Dra. Ettie Rukmigarsari, M.Kes.,selaku konsultan penelitian dan analisis data statistik atas bantuannya dalam penelitian ini hingga selesai.

10. Rektor dan Direktur Diploma III Kebidanan Universitas Almuslim yang telah memberikan kesempatan penulis untuk melanjutkan studi dan untuk segala bantuan baik materil maupun non materil selama penulis menempuh pendidikan.

11. Ayahanda, ibunda, suami, adik-adik tersayang serta keluarga, atas motivasi dan dukungan baik moril maupun materil selama menempuh pendidikan Magister Kebidanan.

12. Teman-teman tim penelitian (Dewita, Sekar Handayani, Lianita Primi Oktaviana, Intiyaswati), atas kerjasama, motivasi dan dukungan selama penyusunan tesis ini.

13. Teman-teman Magister Kebidanan angkatan 2016, atas kebersamaan, kekompakan, dukungan dan semangat selama pengerjaan tesis ini. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih belum sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun agar penyusunan tesis ini lebih baik kedepannya.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih belum sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun agar tesis ini lebih baik kedepannya.

Malang, Juli 2018

Penulis



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ketidaksuburan (infertilitas) pada wanita merupakan tidak mempunyainya seorang wanita untuk mengandung, dan melahirkan (Deka dan Sarma, 2010).

Di dunia, terdapat 10 sampai 15 persen pasangan yang mengalami infertilitas pada usia reproduksi. Dalam beberapa tahun terakhir, jumlah pasangan yang mencari pengobatan untuk infertilitas meningkat secara drastis. Secara umum, wanita menunjukkan tingkat kesuburan yang lebih rendah dibandingkan laki-laki. Berbagai penelitian mendukung teori tersebut bahwa wanita memiliki tingkat kesuburan yang lebih rendah dibandingkan dengan laki-laki (Deka KP dan Sarma S, 2010).

WHO (2012) memperkirakan sekitar 50-80 juta pasangan mengalami infertilitas di dunia. Infertilitas dinegara berkembang terjadi lebih tinggi yaitu sekitar 30% dibandingkan negara maju yaitu 5-8%. Prevalensi di Asia yaitu 30,8% di Kamboja, 10% di Kazakhtan, 43% di Turkmenistan, dan 21,3% di Indonesia (Konsensus Penanganan Infertilitas, 2013).

WHO menjelaskan bahwa Indonesia menduduki peringkat ke 3 dari 10 negara dengan perokok terbanyak di dunia. Sedikitnya terdapat 57 juta perokok di Indonesia, dimana sebanyak 88% merupakan perokok kretek. Satu studi menyatakan bahwa produk tembakau alternatif ini menghasilkan lebih banyak nikotin, karbon monoksida, dan tar dibandingkan dengan rokok putih (Joseph *et al.*, 2016).

Beberapa studi membuktikan bahwa ada hubungan antara merokok dengan penurunan tingkat kesuburan. Dechanet *et al.*, (2011) melibatkan wanita yang merokok dan wanita yang bukan perokok, dimana didapatkan hasil bahwa

wanita yang merokok memiliki tingkat kesuburan yang lebih rendah (47%) dibandingkan dengan wanita yang bukan perokok yang memiliki tingkat kesuburan yang baik (14%), mereka percaya bahwa merokok secara signifikan dapat mengganggu tingkat kesuburan. Penelitian yang melibatkan prosedur *In Vitro Fertilization* (IVF) menunjukkan bahwa asap rokok memiliki efek buruk pada semua tahap reproduksi seperti sensitivitas ovarium, penurunan jumlah oosit, gangguan pembuahan dan implantasi.

Asap rokok diketahui dapat menyebabkan pembelahan sel menjadi lebih lambat, menyebabkan kerusakan DNA, menghambat waktu penyembuhan luka, dan menurunnya kemampuan memperbaiki jaringan dengan mengurangi aliran darah. Asap rokok telah terbukti menyebabkan kerusakan arteri ireversibel atau kerusakan organ yang tidak dapat diperbaiki. Komponen utama pada rokok terdapat kandungan bahan berbahaya seperti nikotin, nitrosamin, timah hitam, cadmium dan gas carbon monoxide yang menghambat fungsi sel darah merah dan dapat menyebabkan vasokonstriksi dan penurunan kadar O_2 dalam darah (Wahl *et al.*, 2016).

Stres oksidatif merupakan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan antioksidan yang terdapat didalam tubuh sehingga menyebabkan gangguan didalam tubuh. Kondisi ini dapat menyebabkan terjadinya suatu reaksi antara radikal bebas dengan protein, asam nukleat dan lemak sehingga akan terjadi kerusakan atau disfungsi organ tertentu. Produksi ROS yang lebih tinggi dalam tubuh dapat mengubah struktur DNA menjadi non aktivasi sehingga dapat menurunkan ekspresi gen, penurunan beberapa faktor transkripsi yang disebabkan oleh stres oksidatif, dan produksi sitokin proinflamasi dan anti inflamasi (Birben *et al.*, 2012). Stres oksidatif yang meningkat menyebabkan terjadinya peroksida lipid. Peroksidasi lipid bisa mengakibatkan suatu gangguan dihipotalamus. Gangguan ini akan berefek pada

FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) maupun LH (*Luteinizing Hormone*), sehingga paparan asap rokok dapat menyebabkan penurunan jumlah sel spermatogenik dan motilitas spermatozoa. Tingginya kadar ROS dalam tubuh dapat menyebabkan 40,88% pria mengalami penurunan tingkat kesuburan (Kardi, 2015).

Studi yang dilakukan oleh Aritonang (2014) mengatakan bahwa, kelompok tikus yang diberi asap rokok berpengaruh terhadap penurunan ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada sel kelenjar endometrium. Hal tersebut diakibatkan karena penurunan kadar hormon 17β -estradiol. Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Michaud *et al.*, (2003) secara *in vivo* mengatakan bahwa tikus yang terpapar asap rokok atau *Mice Exposed Smoke* (MES) terbukti mengalami penurunan angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru yang signifikan. Penghambatan angiogenesis oleh asap rokok secara *in vitro* dan *in vivo* dikaitkan dengan penurunan ekspresi dari *Hypoxia Inducible Factor 1 α* (HIF-1 α) dan faktor pertumbuhan endotel vaskular pada kondisi hipoksia. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa paparan asap rokok merusak angiogenesis dengan menghambat VEGF melalui penurunan ekspresi HIF-1 α dalam kondisi hipoksia.

Pertumbuhan endotel vaskular berperan utama dalam proses proliferasi pada endometrium. Proses penting tersebut bertujuan untuk perkembangan normal endometrium rahim selama siklus reproduksi dan implantasi, sehingga apabila terjadi hambatan pertumbuhan pembuluh darah baru (angiogenesis), maka akan terjadi gangguan fungsi pembuluh darah yang berakibat kelainan pada siklus menstruasi, amenorea, serta kegagalan nidasi hasil konsepsi (Kazi and Koos, 2007). Pada endometrium diperlukan ekspresi VEGF untuk pertumbuhan siklus endometrium dan implantasi (Hastings *et al.*, 2003). Estrogen juga terlibat dalam regulasi VEGF dimana estrogen memiliki peranan penting dalam sistem

reproduksi terutama pada siklus menstruasi, dimana fungsinya dapat menimbulkan proliferasi dari endometrium baik pada kelenjar atau stroma (Nayak and Breneer, 2002).

Buah bit merah (*Beta vulgaris L.*) adalah salah satu sumber utama akan serat pangan dan terdapat berbagai vitamin serta mineral yang berfungsi sebagai antioksidan yang potensial dan membantu mencegah infeksi dalam tubuh. Buah bit memiliki senyawa polifenol, betalain, flavonoid, asam folat juga vitamin. Antioksidan terbanyak terdapat dalam senyawa betalain dan berguna untuk mengendalikan radikal bebas (Mroczek *et al.*, 2012).

Saat ini, terdapat banyak individu yang merokok dan terpapar dengan asap rokok, ini mempengaruhi kesehatan terutama dapat meningkatkan stres oksidatif diberbagai organ tubuh termasuk organ reproduksi. Dari beberapa penelitian yang dilakukan, terpaparnya dengan asap rokok dapat merusak pertumbuhan pembuluh darah yang baru (angiogenesis) dengan menghambat VEGF melalui penurunan ekspresi HIF-1 α dalam kondisi hipoksia, mengganggu tingkat kesuburan, terganggunya kinerja hormon pada sistem reproduksi wanita, salah satunya yaitu hormon estrogen yang terlibat dalam regulasi VEGF, dimana VEGF berperan dalam meningkatkan permeabilitas arteriole mikro dan angiogenesis pada endometrium. Studi ini dilakukan karena peneliti ingin mengetahui efek pemberian buah bit sebagai antioksidan dengan berbagai dosis terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah Umum

Apakah ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) berpengaruh terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok ?

1.2.1. Rumusan Masalah Khusus

- a. Apakah paparan asap rokok dapat menurunkan ekspresi VEGF pada endometrium tikus.
- b. Apakah paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah arteriole pada endometrium tikus.
- c. Apakah ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan ekspresi VEGF pada tikus yang dipapar asap rokok.
- d. Apakah ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.
- e. Apakah ada hubungan antara dosis dan efek bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan peningkatan VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang di papar asap rokok.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L.*) terhadap pencegahan ketidaksuburan melalui peningkatan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus karena paparan asap rokok.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Membuktikan asap rokok dapat menurunkan ekspresi VEGF pada endometrium tikus.
- b. Membuktikan asap rokok dapat menurunkan jumlah arteriole pada endometrium tikus.

c. Membuktikan ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

d. Membuktikan ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

e. Membuktikan hubungan antara dosis dan efek bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan peningkatan VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang di papar asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Dapat menambah pengetahuan tentang bit merah (*Beta vulgaris L.*) sebagai antioksidan dan dapat digunakan sebagai sumber rujukan untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Klinis

Pemanfaatan bit merah (*Beta vulgaris L.*) sebagai antioksidan dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan karena stres oksidatif dari paparan asap rokok dapat berefek negatif pada sistem reproduksi wanita.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paparan asap rokok

Morbiditas dan mortalitas kasus kardiovaskular salah satunya terjadi karena merokok dan terpapar dengan asap rokok yang dihirup, ini terus menjadi krisis kesehatan global dimana kasusnya terjadi terutama di negara yang berpenghasilan rendah dan menengah dengan kekurangan infrastruktur untuk mengembangkan dan menerapkan masyarakat yang peduli akan kesehatannya terutama membatasi diri dari ketergantungan rokok. Di Amerika Serikat, pernah dilakukan kampanye atau penyuluhan tentang merokok dan keterpaparan asap rokok, dan terjadi penurunan merokok pada 50 tahun yang lalu, namun lambatnya penghentian masyarakat dalam merokok diakibatkan salah satunya karena kecanduan rokok yang tinggi (Morris *et al.*, 2015).

Merokok dianggap sebagai penyebab utama dari gagalnya suatu kehamilan, kematian bayi yang meningkat serta kejadian penyakit lambung kronis. Ini juga bisa mengganggu kerjanya paru-paru dikarenakan hemoglobin lebih mudah membawa karbondioksida dari pada membawa oksigen. Perokok aktif dan perokok pasif menyebabkan kadar oksigen didalam darah menurun menjadi 15 persen dari kadar oksigen normal. Reaksi yang terjadi didalam tubuh dapat dilihat dibawah ini :



Nikotin menyebabkan gangguan aliran darah yang memberikan pengaruh ke seluruh tubuh, salah satunya denyut jantung yang cepat, menurunkan suhu kulit, karena penyempitan pembuluh darah serta menyebabkan hati melepaskan

gula ke dalam aliran darah. Nikotin sama halnya dengan obat yang bersifat aditif yang menyebabkan kecanduan (Nurrahmah, 2014).

Rokok memiliki 2500 komponen kimia, dari jumlah tersebut 1100 komponen menjadi asap tanpa perubahan dan 1400 komponen lainnya mengalami dekomposisi dan terpecah. Setiap satu batang rokok yang dibakar akan mengeluarkan lebih dari 5000 bahan kimia seperti partikel nikotin, nitrosamin, timah hitam atau plumbum (Pb), cadmium, dan gas carbon monoxide (CO), benzen dan banyak lagi lainnya. Kandungan kimia rokok di atas merupakan *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau biasa disebut dengan oksidan atau radikal (Ridhoila dkk, 2017).

Proses pembuatan rokok terdiri dari dua yaitu:

- a) Rokok yang dibuat dengan tangan atau hanya menggunakan alat bantu sederhana disebut Sigaret Kretek Tangan (SKT)
- b) Dan rokok yang dibuat dengan mesin adalah Sigaret Kretek Mesin (SKM).

Rokok tersebut dihasilkan dalam bentuk batangan.

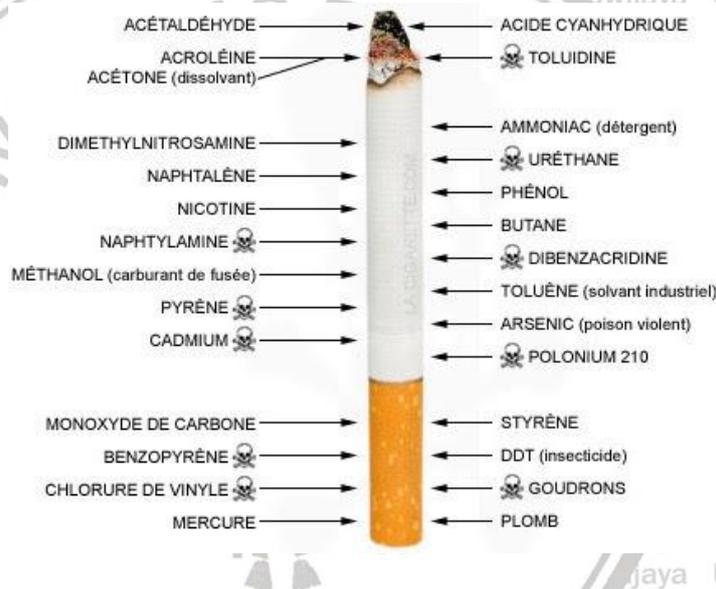
Untuk komposisi masing-masing rokok antara buatan tangan dan buatan mesin tidak terdapat perbedaan komposisinya. Dimana yang membedakan hanya pada rokok buatan mesin, ukuran lingkaran dan pangkal rokok sama besar.

Berdasarkan penggunaan filter pada rokok maka rokok diklarifikasikan menjadi rokok filter (RF) yang terdapat gabus pada bagian pangkalnya, dan rokok non filter (NRF) yang tidak terdapat gabus pada bagian pangkalnya (Jaya, 2009).

2.2 Kandungan kimia dalam rokok

Setiap satu batang rokok yang dibakar akan mengeluarkan lebih dari 5.000 bahan kimia seperti partikel nikotin, nitrosamin, timah hitam atau plumbum (Pb), cadmium, dan gas *carbon monoxide* (CO), nitrogen oksida, hidrogen sianida, amonia, akrolein, benzen, etanol, serta formaldehid. Kandungan kimia

rokok di atas merupakan *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau biasa disebut dengan oksidan atau radikal. Kandungan kimia rokok menyebabkan peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan sehingga terjadi gangguan keseimbangan yang akan menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat merusak DNA sel-sel jaringan reproduksi. ROS merusak DNA lewat modifikasi basa DNA dan kerusakan rantai tunggal atau ganda. Hal ini akan menyebabkan terbentuknya lesi pada DNA, terjadinya kesalahan dalam mekanisme perbaikan DNA atau perbaikan DNA yang tidak selesai. Pada akhirnya akan terjadi kerusakan pada gen yang mengarah pada apoptosis sel (Ridhoila dkk, 2017).



Gambar 2.1 Bahan yang terkandung dalam rokok

Keterangan : Rokok berisi bahan kimia beracun yang berupa fase gas dan fase tar.

2.2.1 Fase Rokok

Rokok terdiri dari 2 fase yang berbahaya yaitu gas dan tar, berikut penjelasannya:

a. Fase Gas

Terdapat kumpulan gas berbahaya yang dihasilkan oleh asap rokok seperti karbonmonoksida, primidim, nitrogenoksida, hidrogensianida, dan lainnya. Radikal bebas yang terdapat dalam fase gas memiliki daya tahan

yang rendah daripada fase tar. Radikal bebas dalam fase ini mengandung lebih dari 10^{15} radikal per hisapan (Haris dkk, 2012).

b. Fase Tar

Satu gram tar mengandung 10^{17} radikal dengan jenis yang berbeda dan terdiri dari kresol, fenol, dibenzo karbasol, hidro karbona aromatik dan masih banyak lainnya (Haris dkk, 2012).

2.3 Infertilitas

2.3.1 Pengertian

Infertilitas adalah tidak berhasilnya terjadi proses kehamilan pada satu pasangan setelah melakukan hubungan seksual secara teratur tanpa alat pelindung selama 12 bulan. Penyebab infertilitas pada pria dikelompokkan menjadi tiga berdasarkan efek pada satu atau lebih kelainan dari tingkat pretestikular, testikular, dan posttestikular. Infertilitas juga memiliki beberapa faktor resiko diantaranya yaitu umur dan gaya hidup, gaya hidup merupakan faktor resiko infertilitas yang dapat dirubah, salah satunya adalah merokok (Ridhoila dkk, 2017).

Asap rokok memberikan beberapa dampak negatif meliputi perubahan bentuk spermatozoa menjadi tidak normal, mengurangi jumlah bilangan spermatozoa, dan menurunkan kecepatan spermatozoa menuju sel telur sehingga sperma akan gagal membuahi sel telur dan berakhir pada kemandulan atau infertilitas (Nani dkk., 2015).

2.3.2 Patofisiologi Infertilitas

Infertilitas merupakan salah satu penyebab utama yang mempunyai kaitan dengan ovarium seperti ketidakmampuan ovulasi yang disebabkan karena kelainan pada ovarium, penyakit endometriosis, sindrom ovarium polikistik, dan penurunan fase luteal karena sel telur yang atresia. Gangguan ovulasi juga dapat

disebabkan karena kegagalan pada hipotalamus dan hipofise pada saat produksi gonadotropin rendah dan estradiol rendah. Disfungsi ovulasi dapat diklarifikasikan dengan melihat uji hormon FSH, Estradiol (E2) dan hormon pada hipotalamus dan kelenjar pituitari. Ovarium yang tidak berfungsi dikarenakan stimulasi yang tidak cukup pada hormon gonadotropin (Broeman and Fauser, 2016).

2.4 Radikal Bebas, ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan Stres Oksidatif

2.4.1 Radikal Bebas

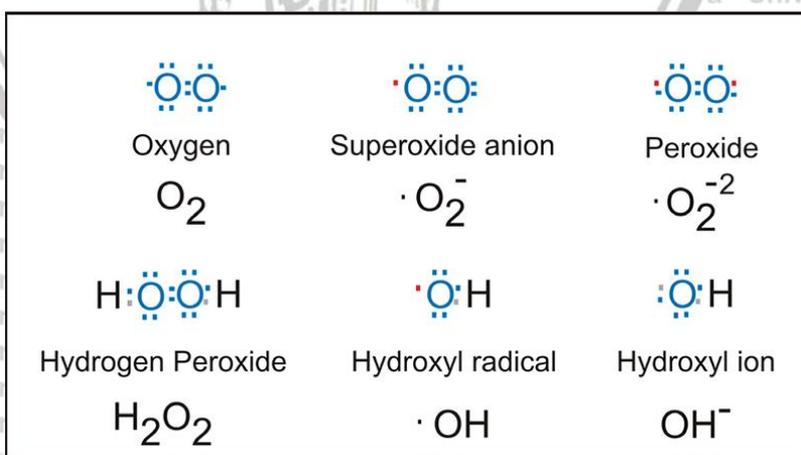
Suatu spesies molekuler yang memiliki elektron dan tidak berpasangan. Ini menghasilkan sifat yang paling umum yang dimiliki oleh sebagian besar radikal, banyak radikal tidak stabil dan bersifat reaktif. Mereka dapat menyumbangkan elektron atau menerima elektron dari molekul lain, sehingga berfungsi sebagai oksidan atau reduktan. Sasarannya mencakup banyak molekul dalam tubuh, diantaranya, lipid, asam nukleat, dan protein. Radikal bebas menyerang makromolekul penting serta menyebabkan rusaknya sel (Lobo *et al.*, 2010).

Radikal bebas dan ROS lainnya berasal dari proses metabolisme normal didalam diri seseorang (endogen), misalnya radikal dari mitokondria, santon oksidase, NADPH oksidase, mikrosom, membrane inti sel dan peroksisom (Setiati, 2003), sedangkan radikal dari luar tubuh (eksogen) seperti terpapar sinar matahari, ozon, udara tidak bersih, dan terpapar bahan berbahaya dari industri. Pembentukan radikal bebas terus terjadi pada sel sebagai reaksi enzim dan nonenzim. Reaksi enzimatik berfungsi sebagai sumber radikal, termasuk yang terlibat dalam rantai pernapasan, fagositosis, sintesis prostaglandin, dan sistem sitokrom P-450, dan radikal bebas yang terbentuk dalam reaksi nonenzimatik oksigen dengan senyawa organik dan juga yang diprakarsai oleh reaksi pengion (Lobo *et al.*, 2010).

2.4.2 Definisi ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Gambaran dari sejumlah molekul reaktif dan berasal dari oksigen, yang diproduksi selama transpor elektron mitokondria respirasi aerobik atau enzim oksidoreduktase dan oksidasi katalis logam. Awalnya diperkirakan hanya sel fagositik yang bertanggung jawab atas produksi ROS sebagai bagian dalam mekanisme pertahanan sel inang. Penemuan terbaru menunjukkan bahwa ROS berperan dalam pensinyalan sel termasuk apoptosis, ekspresi gen, dan aktivasi pensinyalan sel. Perlu diketahui bahwa ROS dapat berfungsi baik sebagai utusan intra dan antar sel (Held, 2012).

Sebagian besar spesies oksigen reaktif dihasilkan sebagai produk sampingan selama transpor elektron mitokondria. Selain itu ROS dibentuk sebagai zat antara reaksi oksidasi katalis yang dikatalisis. Oksigen atom memiliki dua elektron yang tidak berpasangan dalam orbit terpisah pada kulit elektron luarnya. Struktur elektron ini membuat oksigen rentan terhadap pembentukan radikal. Pengurangan oksigen secara berurutan melalui penambahan elektron menyebabkan terbentuknya sejumlah ROS seperti superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil, ion hidroksil, dan oksida nitrat (Held, 2012).



Gambar 2.2 Struktur elektron dari spesies oksigen reaktif umum. Setiap struktur dilengkapi dengan nama dan rumus kimia. Merah menunjukkan sebuah elektron yang tidak berpasangan.

2.4.3 Definisi Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan dimana kekuatan oksidatif melebihi sistem antioksidan karena hilangnya keseimbangan antara keduanya, sifatnya berbahaya dikarenakan menyerang molekul biologis seperti lipid, protein dan DNA. Stres oksidatif juga diketahui terlibat dalam patogenesis penyakit terkait gaya hidup seperti aterosklerosis, hipertensi, diabetes mellitus, penyakit iskemik, dan keganasan (Yoshikawa and Naito, 2002).

Stres oksidatif timbul saat produksi spesies oksigen reaktif menguasai pertahanan antioksidan intrinsik. Spesies oksigen reaktif memainkan peran penting sebagai sinyal intraselular yang bertujuan mempertahankan sel di homeostasis dengan lingkungan sekitarnya. Pada tingkat yang lebih tinggi, mereka dapat menyebabkan kerusakan pada molekul biologis, yang menyebabkan hilangnya fungsi dan bahkan kematian sel (Burton and Jauniaux, 2011).

Stres oksidatif tidak hanya memiliki efek sitotoksik, tetapi juga mempunyai peran penting dalam modulasi yang mengatur fungsi membran sel esensial yang berfungsi untuk kelangsungan hidup. Ini mempengaruhi status redoks intraselular, yang menyebabkan aktivasi protein kinase, termasuk rangkaian kinase tirosin reseptor dan non reseptor, dan protein kinase C yang menginduksi berbagai respons seluler. Protein kinase ini berperan penting dalam respons seluler seperti aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi, serta berbagai fungsi lainnya. Dengan demikian, protein kinase mempunyai paling banyak hubungan antara stres oksidatif dan penyakit (Yoshikawa and Naito, 2002).

2.4.4 Efek ROS terhadap Sel

ROS pada tingkat rendah berfungsi sebagai molekul pensinyalan untuk menengahi proliferasi sel, migrasi, dan diferensiasi dan ekspresi gen. Tingkat ROS pada sel induk dan sel progenitor memiliki korelasi yang jelas dengan fungsi

seluler dan diatur oleh penyesuaian keseimbangan antara sistem pertahanan ROS dan antioksidan. Sedangkan tingkat ROS yang tinggi memiliki efek merugikan pada sel punca melalui induksi stres oksidatif. Tingkat fisiologis ROS memainkan peran penting dalam peraturan keputusan sel induk (Maraldi *et al.*, 2015).

Didalam sel, ROS berfungsi sebagai molekul pensinyalan, namun juga dianggap sebagai produk sampingan toksik yang tidak terhindarkan dari metabolisme aerob. Beberapa organisme menampilkan toleransi terhadap tingkat ROS yang ekstrim, yang menyoroti kemungkinan bahwa ROS mungkin tidak beracun seperti yang diperkirakan sebelumnya. Beberapa proses kematian sel yang semula diperkirakan berasal dari toksisitas langsung ROS (yaitu, stres oksidatif) baru-baru ini terbukti menjadi bagian dari jalur kematian sel terprogram atau fisiologis. Studi terbaru menunjukkan bahwa tingkat dasar ROS diperlukan untuk proses biologis dasar seperti proliferasi dan diferensiasi seluler. ROS sebagian besar bermanfaat untuk sel, mendukung proses seluler dan viabilitas dasar, dan stres oksidatif hanyalah hasil dari aktivasi jalur kematian sel fisiologis yang disengaja. Mempertahankan tingkat basal ROS dalam sel sangat penting untuk kehidupan (Mittler, 2017).

Reactive oxygen species (ROS) terlibat dalam proses perkembangan regulasi fisiologis, misal munculnya sel induk pada darah embrio atau diferensiasi kardiomyosit embrio. Ada juga yang mengatakan bahwa meningkatnya ROS terbukti terlibat pada proses biologis yang berbeda, mulai dari ekspresi gen dan terjemahan protein hingga interaksi protein-protein. ROS berfungsi dalam pensinyalan seluler, menyebarkan sinyal dari satu jaringan ke jaringan lainnya, dan dalam memberikan isyarat dari suatu lingkungan menjadi respons seluler untuk menyeimbangkan masukan seluler, misalnya nutrisi dan sitokin dengan respon sel yang tepat. Dengan kemajuan genomik dan proteomik, peningkatan

informasi tentang cara ROS mengendalikan proses seluler, terutama pada sel induk, perubahan keadaan oksidasi atau dikenal sebagai peraturan redoks, mungkin bertanggung jawab atas komunikasi antara mitokondria dan nukleus (Bigarella, Liang and Ghaffari, 2014).

2.4.5 Asap rokok dan Radikal Bebas

Paparan asap rokok dapat menyebabkan kerusakan pembuluh darah diseluruh tubuh dan membuat darah lebih cenderung menggumpal. Bahan kimia dalam asap rokok dapat merusak lapisan paru-paru yang halus dan menjadikan penurunan paru-paru menukar O₂ secara efisien. Hal ini dapat mengakibatkan penyakit paru kronis, peradangan, rusaknya sel. Tubuh mengontrol sel darah putih merespons luka, infeksi, dan kanker. Jumlahnya cenderung lebih tinggi pada seseorang terus merokok, tubuh berusaha melawan kerusakan yang disebabkan oleh merokok (Benjamin, 2012).

Asap rokok juga dianggap sebagai pemicu utama dalam patogenesis asma dan sebagai pemicu gejala akut. Paparan asap rokok mengaktifkan kaskade inflamasi diepitel saluran nafas menghasilkan produksi jumlah sitokin dan kemokin potensial, disertai kerusakan pada epitelium paru, peningkatan permeabilitas, dan perekrutan makrofag dan neutrofil jalan nafas. Bahkan paparan asap rokok secara singkat dapat meningkatkan ekspresi IL-8 dalam sel epitel bronkial manusia atau *Human Bronchial Epithelial Cells* (HBEs). Peningkatan pelepasan kemokin IL-8 juga menyebabkan infeksi HBE yang terpajan untuk ekstrak asap rokok atau *Cigarette Smoke Extract* (CSE) (Hellermann *et al.*, 2002).

2.4.6 Pengaruh Asap Rokok Terhadap Organ Reproduksi Wanita

Terpaparnya dengan asap rokok akan menyebabkan stres oksidatif atau *Oxidative stress* (OS), dimana keadaan ini ditandai dengan ketidakseimbangan antioksidan dan pro oksidan didalam tubuh. Diketahui pula efek buruk dari stres

oksidatif berpengaruh terhadap kualitas dan fungsi dari sperma. Sedangkan pada wanita, dampak dari stres oksidatif terhadap oosit dan fungsi organ reproduksi lainnya. Ketidakseimbangan antara pro oksidan dan antioksidan dapat menyebabkan sejumlah penyakit pada organ reproduksi seperti endometriosis, *Polycystic Ovary Syndrome* (PCOS), dan infertilitas. Terdapat juga komplikasi kehamilan yang disebabkan oleh stres oksidatif seperti abortus spontan, abortus berulang, dan preeklampsia. Penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa gaya hidup seperti merokok, menggunakan alkohol, penggunaan narkoba dan obesitas dapat meningkatkan produksi radikal bebas yang berlebihan yang dapat mempengaruhi kesuburan. Paparan terhadap suatu pencemaran lingkungan juga menjadi dampak yang sangat memprihatinkan, dikarenakan ini salah satu pemicu terjadinya stres oksidatif yang mungkin berpengaruh terhadap infertilitas pada wanita (Agarwal, 2012).

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, asap rokok mengandung beberapa ribu komponen (misalnya nikotin, hidrokarbon aromatik polisiklik dan kadmium) dengan efek yang beragam. Salah satu target dari paparan asap rokok yaitu gangguan fungsi dari organ reproduksi seperti penurunan folikulogenesis (proses perkembangan folikel didalam ovarium), steroidogenesis, transportasi embrio, reseptor endometrium, angiogenesis endometrium, aliran darah uterus dan miometrium uterus. Efek asap rokok tergantung pada dosis, zat beracun dan status hormonal. Waktu dan jenis paparan asap rokok juga berperan pada tingkat kesuburan manusia (Dechanet *et al.*, 2011).

Senyawa asap rokok yang masuk kedalam ovarium dapat mengakibatkan folikel beracun, menginduksi peningkatan stres oksidatif, gangguan meiosis dan aktivasi jalur kematian sel. Akibatnya adalah kehilangan folikel, pertumbuhan folikel abnormal, dan penurunan nilai pematangan morfologi dan oosit (Dechanet *et al.*, 2011).

2.5 Endometrium

2.5.1 Histologi Endometrium

Merupakan mukosa yang melapisi kavitas uteri perempuan tidak hamil, yang merupakan membran tipis, warna merah muda, dimana pada pemeriksaan yang dekat terlihat berlubang karena banyaknya ostia kelenjar-kelenjar uterus. Ketebalan endometrium bervariasi pada tingkat ketebalannya, misalnya epitel permukaan, kelenjar dan jaringan mesenkim interglandular yang dan terdapat banyak pembuluh darah. Epitel tersebut terdiri dari selapir kolumnar tinggi, padat dan terletak di atas membran basalis yang tipis. Kelenjar uterus tubular merupakan invaginasi epitel. Kelenjar ini membentang diseluruh ketebalan endometrium menuju miometrium, yang terkadang sedikit menembus. Jaringan ikat diantara epitel permukaan dan miometrium merupakan stroma mesenkim. Secara histologis, stroma sangat bervariasi sepanjang siklus ovarium. Khususnya, mengikuti ovulasi, desisualisasi kompartemen stroma yang berkembang dipertengahan fase luteal. Proses perubahan struktur endometrium ini untuk persiapan kehamilan dan termasuk perubahan sekresi kelenjar uterus serta perubahan struktur vaskular (Cunningham, *et al*, 2016).

Secara morfologi rahim bisa terbagi dalam lapisan fungsionalis yang terletak pada 2/3 bagian basalis dan terletak pada 1/3 bagian bawah. Lapisan fungsionalis bekerja menyiapkan rahim terhadap penanaman blastosit, sehingga lapisan ini menjadi tempat terjadinya proliferasi, sekresi, degenerasi. Lapisan basalis bekerja menyiapkan rahim saat lapisan fungsionalis menghilang ketika terjadi menstruasi (Speroff *et al.*, 1999).

2.5.2 Siklus Endometrium

Ciri pertumbuhan dan fungsional endometrium manusia bersifat unik. Sel epitelial glandular, sel mesenkimial stromal, dan pembuluh darah endometrium cepat membelah secara siklis pada perempuan usia subur. Endometrium

mengalami regenerasi pada setiap siklus ovarium endometrium. Endometrium superfisial, yang disebut lapisan fungsional meluruh dan dibentuk ulang dari lapisan basal yang lebih dalam sebanyak hampir 400 kali selama masa subur sebagian besar perempuan. Tidak ada jaringan tubuh lain pada manusia yang memiliki gambaran peluruhan dan pertumbuhan ulang seluruh jaringan secara siklis seperti halnya pada endometrium (Cunningham, *et al*, 2016).

Produksi estradiol pada fase folikular merupakan faktor terpenting yang menentukan regenerasi endometrium pascamenstruasi. Meskipun dua pertiga endometrium yang fungsional mengalami fragmentasi dan meluruh selama menstruasi, reepitelisasi telah dimulai bahkan sebelum perdarahan menstruasi berhenti. Pada hari kelima menstruasi, permukaan epitel endometrium telah kembali dan revaskularisasi sedang berlangsung. Endometrium praovulasi ditandai dengan proliferasi sel kelenjar, stroma dan endotel vaskular. Selama fase proliferasi dini, endometrium tampak tipis, biasanya memiliki ketebalan kurang dari 2 mm. Kelenjar pada tahap ini memiliki struktur tubular yang sempit dan berjalan hampir lurus dan sejajar dari lapisan basal hingga ke permukaan rongga endometrium. Fase proliferasi lanjut, endometrium menebal akibat hiperplasia kelenjar dan peningkatan substansi dasar stroma, yaitu edema dan materi berprotein. Stroma yang longgar merupakan gambaran yang menonjol, dan kelenjar dalam lapisan fungsional terpisah sangat jauh. Memisahkannya tampak sangat jauh karena dibandingkan dengan lapisan basal. Pada lapisan basal, kelenjar terlihat lebih rapat dan stroma lebih padat. Pada pertengahan siklus, menjelang menstruasi, epitel kelenjar menjadi lebih tinggi dan berlapis. Epitel dipermukaan memiliki banyak mikrovilus, yang menambah luas permukaan septelium, serta silia yang membantu pergerakan sekret endometrium saat fase sekretorik (Cunningham, *et al*, 2016).

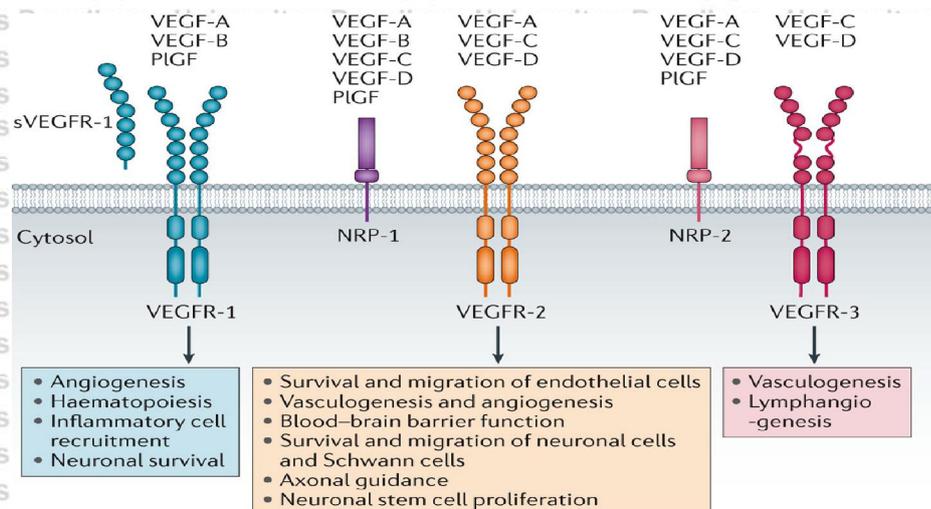
2.6 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF adalah molekul utama yang dibutuhkan untuk pengembangan sel endotel, organisasi, migrasi dan morfogenesis. Sel endotel dan sistem vaskular mengekspresikan homolog VEGF, yang menunjukkan peran potensial di luar angiogenesis dan vasculogenesis (pembentukan pembuluh darah dari sel-sel endotel). VEGF juga merupakan golongan faktor angiogenik terbaik, dimana memiliki kekuatan utama dibalik angiogenesis tumor dan pembentukan seluruh pembuluh darah. VEGF mampu memicu proses seperti sekresi protase, migrasi dan proliferasi (Schlieve *et al.*, 2016).

2.6.1 Kelompok VEGF

VEGF atau VEGF-A terdiri dari beberapa kelompok. Secara historis, VEGF ditemukan pada manusia sebagai faktor pertumbuhan sel endotel yang mampu merangsang pembentukan pembuluh darah (angiogenesis). Dari perspektif evolusioner, polipeptida ini awalnya muncul di *Central Nervous System* (CNS) organisme primitif yang tidak memiliki pembuluh darah dan menunjukkan aktivitas yang bebas. Bukti yang berkembang menunjukkan beragam efek VEGF dan masing-masing dari kelompoknya pada sel saraf selama perkembangan dan di masa dewasa (Lange *et al.*, 2016).

Pada manusia, terdiri dari VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E dan *Placental Growth Factor* (PlGF) atau faktor pertumbuhan plasenta (Gambar 2.3). Anggota kelompok VEGF mengikat reseptor kinase tirosin permukaan sel. Beberapa anggota juga mengikat reseptor non-tirosin kinase dari kelompok neuropilin (NRP), NRP-1 dan NRP-2 (juga reseptor untuk semaphorins), yang berfungsi sebagai co-reseptor untuk VEGFRs. VEGF berikatan dengan VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 dan NRP-2, VEGF-B berikatan dengan VEGFR-1 dan NRP-1, PlGF berikatan dengan VEGFR-1, NRP-2 dan NRP-1, VEGF-C dan VEGF-D berinteraksi dengan VEGFR-3, VEGFR-2, NRP-1 dan NRP-2 (Lange *et al.*, 2016).



Nature Reviews | Neurology

Gambar 2.3 Kelompok VEGF dari faktor pertumbuhan.

Keterangan: Kelompok tersebut menggambarkan faktor pertumbuhan endotelial vaskular (VEGF) isoforms VEGF (juga dikenal sebagai VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan faktor pertumbuhan plasenta (PIGF), dan pengikatannya terhadap reseptor tirosin kinase VEGFR -1, VEGFR-2 dan VEGFR-3 dan co-receptor neuropilin-1 (NRP-1) dan NRP-2. Efek utama pada reseptor yang mengekspresikan jenis sel dalam pembuluh darah dan Susunan Saraf Pusat. sVEGFR-1 dapat menjebak VEGF-A, VEGF-B dan PIGF dan mengurangi tindakan biologis mereka. sVEGFR-1, VEGFR-1 yang bersifat mudah larut.

2.6.2 Reseptor VEGF

Faktor pertumbuhan endotel vaskular dan reseptornya (VEGFR) telah terbukti memainkan peran utama tidak hanya pada fisiologis tetapi juga pada kebanyakan angiogenesis patologis, seperti kanker. VEGF-A (biasa disebut VEGF) mengatur angiogenesis dan permeabilitas vaskular dengan mengaktifkan 2 reseptor, VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1/Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR/Flk1). Di sisi lain, VEGF-C/VEGF-D dan reseptornya VEGFR-3 (Flt-4), terutama mengatur *lymphangiogenesis* (Shibuya, 2011).

VEGFR sangat terkait dengan kelompok PDGFR, namun, mereka bersifat unik sehubungan dengan struktur dan sistem pensinyalannya. Tidak seperti anggota keluarga PDGFR yang sangat merangsang jalur PI3K-Akt menuju proliferasi sel, VEGFR-2 merupakan transduser sinyal utama untuk angiogenesis, secara istimewa menggunakan jalur PLCγ-PKC-MAPK untuk pensinyalan. Sistem

VEGF-VEGFR merupakan target penting terapi anti angiogenik pada kanker dan juga merupakan sistem yang menarik untuk terapi pro angiogenik dalam pengobatan degenerasi neuron dan penyakit iskemik (Shibuya, 2011).

2.7 Angiogenesis

2.7.1 Definisi

Adanya kapiler baru dari pembuluh darah yang sudah ada disebut angiogenesis, yang dimediasi oleh proses multistep kompleks dan terdiri dari rangkaian kejadian seluler yang menyebabkan neovaskularisasi. Angiogenesis memainkan peran sentral dalam berbagai proses fisiologis dalam tubuh manusia, tidak hanya selama perkembangan janin namun juga dalam perbaikan jaringan setelah operasi atau trauma. Angiogenesis bisa menjadi ciri penyembuhan luka, siklus haid, kanker, dan berbagai penyakit iskemik dan inflamasi. Kesadaran bahwa pertumbuhan tumor dikaitkan dengan pembuluh darah baru membawa kita untuk menyelidiki faktor kimia yang memediasi angiogenesis, memperluas pengetahuan kita tentang proses patologis, dan dengan demikian membuka kemungkinan baru untuk diagnosis dan pengobatan penyakit ini (Yoo and Kwon, 2013).

Proses angiogenesis yang sangat penting dapat digambarkan sebagai beberapa langkah. Pertama, rangsangan angiogenik menyebabkan permeabilitas sel endotel yang meningkat dan proliferasi seluler, yang berlanjut seiring pertumbuhan kapiler baru. Kedua, proteolisis komponen matriselular membran basal adalah proses yang diperlukan untuk meningkatkan invasi sel endotel ke dalam stroma jaringan tetangga, di mana aktivitas kooperatif sistem aktivator plasminogen dan matrik metaloproteinase (MMPs) diperlukan. Ketiga, sel endotel yang dimigrasikan memicu pembentukan lumen karena tunas membentuk struktur multiselular. Kemudian, saluran kapiler baru terbentuk. Akhirnya, kapiler

distabilkan melalui konstruksi membran basal, persimpangan yang melekat, dan sel endotel (Yoo and Kwon, 2013).

2.7.2 Proses terjadinya Angiogenesis

Proses angiogenesis melibatkan interaksi kompleks dan dinamis antara EC (Endothelial Cell) atau sel endotel dan lingkungan ekstraselular yang sesuai.

Secara *in vivo*, angiogenesis terjadi karena berkembangnya EC vaskular dari endothelia kapiler yang sudah ada sebelumnya ke jaringan sekitarnya, atau dengan intususepsi (angiogenesis tanpa tumbuh), yang melibatkan pembelahan kapiler dengan pilar jaringan menjadi dua atau lebih pembuluh janin (Ucuzian *et al.*, 2011).

Dibawah ini adalah proses terjadinya angiogenesis:

a. Pertumbuhan Sel Endotel

Dalam pembuluh darah normal, tebalnya membran basal yaitu 100-200 nm (BM atau Basement Membrane) terletak tepat di dalam monolayer EC di intima arteri, yang tersusun dari laminin, kolagen tipe-IV, kolagen tipe-VIII, dan proteoglikan, BM harus terdegradasi sebelum invasi EC ke matriks ekstraselular sekitarnya (ECM atau *Surrounding Extracellular Matrix*), yang terdiri dari kolagen fibrillar, elastin, dan berbagai ECM lainnya. Sel endotel sebagai respons terhadap rangsangan angiogenik, berpindah dari tidak aktif ke fenotip sintesis aktif yang ditandai oleh indeks mitosis tinggi dan peningkatan kapasitas untuk migrasi dan proteolisis matriks. EC aktif ini mampu mengganggu persimpangan yang ketat, persimpangan yang melekat, dan persimpangan celah yang ada antara EC intim dan sel perivaskular tetangga, dan menyerang ke dalam BM dan ECM sekitarnya. Setelah terbebas dari intima kapiler dan di ruang ekstraselular, EC berkembang biak dan bermigrasi ke arah rangsangan chemotactic dan angiogenic di lingkungan ekstraselular 3-D dan membentuk angiogenik baru.

b. *Lumenogenesis dan Tubulogenesis*

Pembentukan lumen dapat dianggap sebagai ciri khas angiogenesis karena ini adalah perilaku yang relatif spesifik terutama dikaitkan dengan sel epitel dan endotelium. Ini adalah kapasitas EC yang diprogram secara genetik untuk menciptakan kompartemen luminal dalam rantai multiseluler yang memungkinkan aliran darah yang sudah ada sebelumnya ke neovaskulatur, yang tanpanya jaringan kapiler baru tidak dapat menjalankan fungsi utama transportasi oksigen dan nutrisi mereka secara normal.

c. *Inoskopulasi*

Inoskopasi adalah fusi atau anastomosis dari dua lumen vaskular atau segmen luminal untuk membentuk satu lumen kontinyu. Meskipun proses fermentasi pada angiogenesis, beberapa literatur dari bidang vaskularisasi cangkok kulit dapat diekstrapolasikan untuk memberikan beberapa wawasan tentang langkah selanjutnya dari angiogenesis. Pada tahun 1980, Tsukada menunjukkan bahwa pelestarian jaringan vaskular subkutan dari transplantasi kulit yang difasilitasi transfer jaringan bebas, dan ini terkait dengan pembentukan neovaskulogram, serta inulasi antara host yang sudah ada sebelumnya dan pembuluh darah donor. Dengan menganalisis pembentukan kontinuitas pembuluh darah donor atau inang pada kulit yang dicangkokkan, penelitian telah menunjukkan bahwa neovaskularisasi kulit dengan inoskopasi lengkap terjadi antara tiga sampai tujuh hari pasca operasi setelah pencangkokan kulit. Pewarnaan imunohistokimia kulit manusia yang ditransplantasikan ke tikus atletik telah mendokumentasikan invasi EC ke cangkok antara hari ke 3 dan 21 melalui neovaskularisasi dengan aliran darah yang dimulai pada hari 3-7.

2.8 Estrogen

2.8.1 Pengertian Estrogen

Salah satu hormon steroid kelamin dikarenakan mempunyai struktur kimia yang berintikan steroid yang sebagian besar diproduksi oleh kelenjar endokrin sistem reproduksi wanita. Estrogen diproduksi oleh pria namun jumlahnya sangat sedikit (Guyton, 2007).

Hormon estrogen diproduksi didalam sel granulosa folikel ovarium yang sedang tumbuh, korpus luteum dan plasenta. Biosintesis estrogen berasal dari androgen, dan proses aromatisasi dari androstenedion dalam sirkulasi melalui perantaraan enzim aromatase yang mengkatalisis konversi androstenedion menjadi estron dan testosteron menjadi estradiol. Estrogen diproduksi dan disekresikan oleh ovarium. Estron (E1) juga disekresikan oleh ovarium dalam jumlah yang banyak. Sebaliknya, estriol diproduksi dari estradiol dan estron di jaringan tepi dan dari androgen yang disekresi oleh korteks ginjal dan sel teka ovarium (Speroff and Fritz, 2005).

2.8.2 Pengaruh Estrogen terhadap Angiogenesis

Ekspresi VEGF oleh jaringan uterus dan vaskular telah terbukti meningkat dengan estradiol, seperti juga produksi VEGF oleh makrofag pada endometriosis. Selain itu, tumor akibat estrogen tertentu juga dikaitkan dengan peningkatan ekspresi VEGF dan reseptornya. Akhirnya, percepatan pemulihan endotel dengan pengobatan estrogen setelah cedera arteri dikaitkan dengan peningkatan ekspresi VEGF oleh sel otot polos pembuluh darah (LVC). Menariknya, kemungkinan efek androgen pada angiogenesis yang dimediasi VEGF juga telah disarankan (Losordo and Isner, 2001).

Selama fase proliferasi, estrogen berhubungan dengan mekanisme pemanjangan vaskular ditemukan pada endometrium manusia. Banyak penelitian telah dilakukan mengenai efek estrogen pada angiogenesis endometrium. Bukti

menunjukkan efek langsung estrogen pada sel endotel atau secara tidak langsung pada jenis sel endotel lainnya. Estrogen merangsang ekspresi VEGF dengan mempengaruhi sel stroma uterus manusia (Karizbodagh *et al.*, 2017).

Estradiol juga merangsang proliferasi sel endotel di rahim sebagai respons terhadap VEGF. Estrogen memiliki berbagai reseptor seperti ER α dan ER β yang bisa diaktifkan oleh hormon estrogen. Reseptor ER β hanya diidentifikasi pada sel endotel di lingkungan *in vitro* dan *in vivo*, sementara reseptor ER α diidentifikasi di mana-mana namun pada tingkat yang sangat rendah. Kedua reseptor ini telah diidentifikasi pada sel otot polos vena endotelial. Dikatakan bahwa estrogen bisa menjadi angiogenik, sementara menurut data terakhir, estrogen mungkin merupakan penghambat angiogenesis (Karizbodagh *et al.*, 2017).

2.8.3 Angiogenesis pada Endometrium

Pertumbuhan dan regresi di endometrium manusia berbeda secara spasial dan temporal selama rangkaian kejadian ini terjadi pada siklus menstruasi.

Ada tiga tahap yang berbeda ketika angiogenesis terjadi: selama menstruasi untuk memperbaiki tempat vaskular, selama pertumbuhan endometrium yang cepat pada fase proliferaatif dan selama tahap sekretori saat arteriol spiral menunjukkan pertumbuhan dan pembekuan yang signifikan. Sebuah pleksus kapiler subepitel juga berkembang selama siklus menstruasi. Aliran darah melalui pleksus ini mencapai maksimum selama fase sekretor awal dan pertengahan dalam persiapan implantasi embrio. Secara spasial, kejadian angiogenik ini terjadi di berbagai daerah atau zona endometrium. Pasca perbaikan menstruasi terjadi pada lapisan dangkal basalis yang tersisa. Pertumbuhan vaskular fase proliferaatif terjadi di seluruh fungsionalis (Gargett and Rogers, 2001).

Di bawah pengaruh estrogen, penebalan endometrium terjadi kira-kira empat kali lipat. Pertumbuhan arteriol spiral juga terjadi pada lapisan fungsionalis, sedangkan pleksus kapiler yang dipasok oleh arteriol berkembang tepat di bawah

permukaan epitel luminal. Jadi, tidak seperti kebanyakan tempat vaskular lainnya, yang mempertahankan struktur dan fungsi konstan sepanjang hidup adalah pembuluh darah endometrium yang tumbuh dan mengalami regresi selama siklus menstruasi dan memberikan model dinamis untuk ilmu angiogenesis fisiologis (Gargett and Rogers, 2001).

2.9 Pengaruh Asap Rokok terhadap VEGF dan Angiogenesis Endometrium

Faktor pertumbuhan angiogenesis kemungkinan memainkan peran penting dalam fungsi vaskular ibu dan remodeling pembuluh darah ibu selama kehamilan termasuk arteri spiral uterus yang melapisi plasenta. Flt-1 mengikat VEGF dan PlGF, bersaing dengan pengikatan reseptor yang terletak di endotelium, dan dikaitkan dengan fungsi vaskular yang terganggu. Perbedaan yang signifikan pada faktor angiogenik ini mendahului manifestasi klinis preeklampsia. Secara khusus, konsentrasi PlGF yang lebih rendah telah dicatat, sementara konsentrasi sFlt-1 lebih tinggi. Merokok juga dapat mempengaruhi faktor angiogenik dengan konsentrasi sFlt-1 yang beredar lebih rendah pada perokok yang tidak hamil dibandingkan dengan perokok pasif. Bukti terbaru menunjukkan bahwa merokok pada wanita hamil juga dapat menurunkan konsentrasi sFlt-1 ibu. Informasi tentang pengaruh paparan asap rokok pada konsentrasi PlGF ibu masih dikatakan terbatas (Jeyabalan *et al.*, 2008).

Angiogenesis endometrium adalah proses pembentukan pembuluh darah di endometrium. Proses pembentukan pembuluh darah baru dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF). Gangguan endometrium atau gangguan angiogenesis dapat mempengaruhi fungsi endometrium atau dapat menyebabkan infertilitas endometrium. Fungsinya dipengaruhi oleh sekresi estrogen dan hormon progesteron. Salah satu penelitian menemukan bahwa

estrogen meningkatkan kejadian endometrium angiogenesis (Sugijati *et al.*, 2015).

Gangguan angiogenesis endometrium dapat disebabkan karena gaya hidup seperti mengonsumsi minuman beralkohol, merokok, obesitas. Kebiasaan merokok memberi kenikmatan pada si perokok, namun di sisi lain hal itu bisa menimbulkan efek negatif bagi para perokok itu sendiri dan orang-orang disekitarnya, dampaknya akan lebih buruk bagi si perokok sendiri. Rokok dengan zat beracun mengandung salah satu faktor yang mempengaruhi sekresi estrogen.

Efek toksik langsung dari asap rokok masih belum jelas. Beberapa peneliti menduga bahwa asap tersebut memiliki efek menurunkan risiko kanker endometrium. Hal ini diduga karena asap yang diduga mengurangi produksi estrogen dan juga efek estrogen yang paling atrogenik. Teori lain mengatakan bahwa merokok mempengaruhi penyerapan, metabolisme dan distribusi estrogen. Merokok juga dianggap mengubah lebih banyak estrogen menjadi 2 hidroksiestrone dengan efek estrogenik rendah (Sugijati *et al.*, 2015).

2.10 Antioksidan

2.10.1 Definisi

Zat atau senyawa yang menghambat atau menunda reaksi oksidasi dalam jumlah kecil. Pada subjek normal, pertahanan antioksidan endogen menyeimbangkan produksi spesies oksigen reaktif. Sumber antioksidan yang paling banyak terdapat dari makanan yang mengandung fenol. Antioksidan bekerja dengan mengikat radikal bebas seperti (menetralisir radikal bebas, mengurangi konsentrasi peroksida dan memperbaiki selaput teroksidasi, menurunkan produksi spesies oksigen reaktif, menetralisir spesies oksigen reaktif) dan molekul yang sangat reaktif. Pertahanan antioksidan tubuh dapat diketahui dengan mengukur tingkat plasma antioksidan (mikronutrien, enzim,

antioksidan lainnya), dengan mengingat bahwa kompartemen yang beredar hanya mencerminkan aliran antara organ dan jaringan (Fusco *et al.*, 2007).

Antioksidan diproduksi oleh tubuh dan diperoleh melalui makanan merupakan bagian penting dari sistem pertahanan tubuh yang kuat. Untuk memahaminya, penting untuk mengetahui sesuatu tentang oksidasi. Dalam sel, oksigen terus-menerus terlibat dalam reaksi kimia di mana elektron (partikel atom bermuatan) bergeser. Untuk menghasilkan energi, sel kita mengeluarkan elektron dari gula, asam lemak dan asam amino dan menambakkannya ke molekul lain, terutama oksigen (Wellness B, 2014).

2.10.2 Jenis Antioksidan

Antioksidan dibagi menjadi dua yaitu primer dan sekunder, berikut adalah pengelompokan antioksidan primer (Hamid *et al.*, 2010):

- a. Mineral merupakan kofaktor antioksidan enzim, dimana keberadaanya berpengaruh terhadap metabolisme makro molekul kompleks misalnya karbohidrat.
Contoh: selenium, tembaga, besi, seng dan mangan.
- b. Vitamin, dibutuhkan oleh tubuh sebagai fungsi metabolisme.
Contoh: vitamin C, vitamin E, vitamin B.
- c. Fitokimia atau senyawa fenolik seperti flavonoid yang memberikan warna pada buahan, bijian, bunga, daun serta kulit.

Antioksidan sekunder atau sintetik adalah senyawa sintetik yang memiliki fungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai. Berikut adalah contoh antioksidan sintetik: *Butylated Hydroxyl Anisole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT), *Propyl Gallate* (PG) dan *Metal Chelating Agent* (EDTA), *Tertiary Butyl Hydroquinone* (TBHQ), *Nordihydro Guaretic Acid* (NDGA).

Antioksidan utama pada saat ini digunakan dalam produk makanan adalah

monohidroksi atau polihidroksi senyawa fenol dengan berbagai substituen pada cincin (Hamid *et al.*, 2010).

2.11 Buah bit merah (*Beta vulgaris L.*)

Bit merah adalah tanaman sejenis rumput atau hampir sama dengan jenis umbi-umbian. Batangnya terlihat sangat pendek yang terlihat tertimbun dengan tanah. Warnanya yang kemerahan berasal dari senyawa flavonoid yang dipercaya dapat mencegah anemia. Beetroot dipercaya dapat mengaktifkan sel darah merah mentransfer O₂ keseluruh tubuh. Buah bit terlihat sedikit pipih hampir menyerupai buah bengkong, baunya juga sangat khas (Yuwono, 2016).



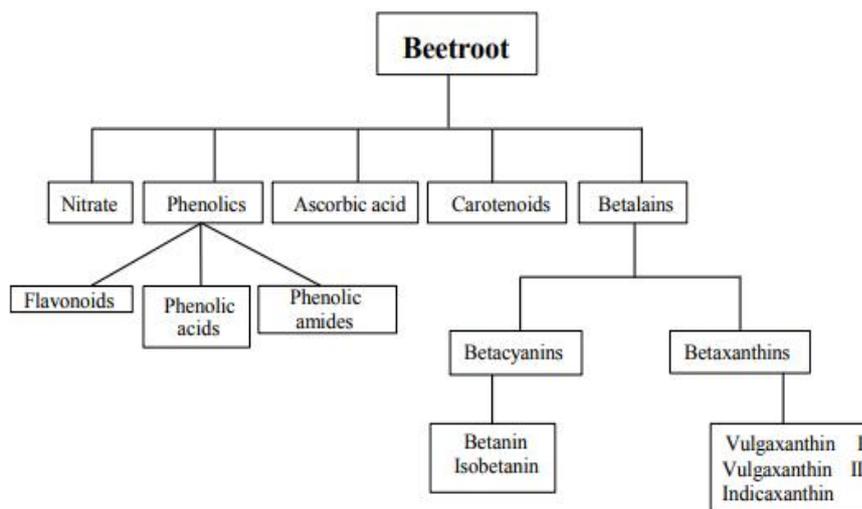
Gambar 2.4 Umbi bit merah

Sebagai sumber nitrat, konsumsi bit memberikan cara alami untuk meningkatkan ketersediaan *Nitric Oxide* (NO) secara *in vivo* dan muncul sebagai strategi potensial untuk mencegah dan mengelola kerusakan yang terkait dengan bioavailabilitas NO yang berkurang, terutama fungsi hipertensi dan endotel. Bit juga dianggap sebagai pengobatan terapeutik yang menjanjikan dalam berbagai patologi klinis yang terkait dengan stres oksidatif dan pembengkakan. Pigmen betalain menampilkan antioksidan yang tinggi, aktivitas anti inflamasi dan kemopreventif secara *in vitro* dan *in vivo* (Clifford *et al.*, 2015).

Seperti kita ketahui bahwa munculnya penyakit kanker adalah adanya kerusakan komponen sel dalam DNA. Kerusakan itu diakibatkan karena tingginya konsentrasi radikal bebas yang masuk dalam tubuh manusia. Buah bit mengandung pigmen ungu yang mampu membunuh sel kanker. Disamping itu, tingginya kandungan zat besi akan meregenerasi sel darah merah. Sel darah merah mampu membawa oksigen ke seluruh sel dalam tubuh, sehingga sel-sel yang terpapar kanker akan tersuplai O₂ secara kontinyu dan sel kanker akan mati.

Wanita yang mempersiapkan kehamilan harus mempunyai pola hidup yang sehat. Diantaranya adalah selalu menjaga asupan makanan yang beragam, gaya hidup yang sehat (tidak menjadi perokok aktif maupun pasif), serta istirahat yang cukup. Masa kesuburan akan sangat membutuhkan sirkulasi darah yang baik ke seluruh tubuh, dalam hal ini adalah pada saat ovulasi (pelepasan sel telur). Kombinasi kandungan asam folat dan zat besi yang tinggi dari buah bit mampu melancarkan peredaran darah yang dibutuhkan pada periode tersebut.

Seperti yang telah diketahui sebelumnya, nitrat bukan satu-satunya penyusun bit yang memberi efek menguntungkan pada kesehatan dan penyakit. Beetroot adalah sumber senyawa fitokimia (Gambar 2.5) yang mencakup asam askorbat, karotenoid, asam fenolik dan flavonoid. Bit juga merupakan salah satu sayuran yang mengandung pigmen bioaktif yang dikenal sebagai betalain. Golongan betalain dikategorikan sebagai pigmen betacyanin yang berwarna merah violet atau pigmen betaxanthin berwarna kuning orange. Sejumlah penelitian mengatakan bahwa betalain memiliki antioksidan tinggi dan antiinflamasi yang tinggi secara in vitro dan beragam model hewan in vivo. Suplemen bit merah juga berfungsi sebagai strategi yang baik untuk memperkuat pertahanan antioksidan endogen dan membantu melindungi komponen selular dari kerusakan oksidatif (Clifford *et al.*, 2015).



Gambar 2.5 Senyawa berpotensi bioaktif dalam bit

2.11.1 Klasifikasi bit merah (*Beta vulgaris L.*)

Dalam taksonomi tumbuhan, *betroots* di kelompokkan sebagai berikut

(Yuwono, 2016) :

- Kingdom : Tumbuhan
- Sub kingdom : Tumbuhan berpembuluh
- Super divisi : Menghasilkan biji
- Divisi : Tumbuhan berbunga
- Kelas : Magnoliophyta/ berkeping dua/ dikotil
- Sub kelas : Hamamelidae
- Ordo : Caryophylales
- Famili : Chenopodiaceae
- Genus : Beta
- Spesies : Beta vulgaris L.

Bit tumbuh didataran tinggi dengan ketinggian 1.000 meter diatas permukaan laut. Agar bit tumbuh dengan baik dan subur, tanah yang akan dijadikan lahan harus gembur dan lembab. Kemudian pH tanah juga harus sesuai dengan jenis tanaman ini. Akan lebih baik penanaman tumbuhan ini dilakukan pada musim hujan dan dipanen saat musim hujan juga. Kandungan bit akan baik

dipanen kira-kira dengan usia 2 bulan, ini juga berpengaruh dengan rasa yang akan dihasilkan oleh bit sendiri. Tanaman ini aslinya berasal dari Mediterania Timur, akan tetapi tanaman ini juga dapat tumbuh di setiap negara asalkan cuacanya sesuai dengan tanaman ini. Di Indonesia sendiri bit sudah banyak dikembangkan, terutama di daerah yang memiliki cuaca dingin, misalnya Batu Jawa Timur, Lembang Jawa Barat, sayangnya masyarakat sendiri belum tau pasti kelebihan tanaman ini, banyak juga yang tidak tau cara makan atau mengolah bit menjadi makanan (Yuwono, 2016).

2.11.2 Kandungan bit merah (*Beta vulgaris L.*)

Dibawah ini dapat dilihat kandungan nutrisi bit dalam 100 gram umbi bit:

| Kandungan gizi | Jumlah |
|-----------------------------------|--------------|
| Air (%) | 76,6 |
| Protein (%) | 1,1 |
| Lemak (%) | 0,8 |
| Karbohidrat (%) | 20,4 |
| Serat (%) <i>Betalain</i> (mg/ml) | 1,10,133 (*) |
| Kalori (Kal) | 336 |
| Sodium (mg) | 472 |
| Kalsium (mg) | 182 |
| Besi (mg) | 8,7 |
| Vitamin A (ugRE) | 315 |
| Vitamin B1 (mg) | 0,24 |
| Vitamin C (ppm) | 790 |
| Vitamin B3 (mg) | 3,15 |

Pigmen yang terdapat pada bit merah dipengaruhi oleh cahaya, O₂, air, pH dan suhu. Semakin tinggi suhu panas maka stabilitas antioksidan dan pigmen akan menurun. Stabilitasnya pigmen bit ini juga dipengaruhi oleh pH dengan kisaran pH antara 4 sampai 6 (Yuwono, 2016).

2.12 Reproduksi Tikus

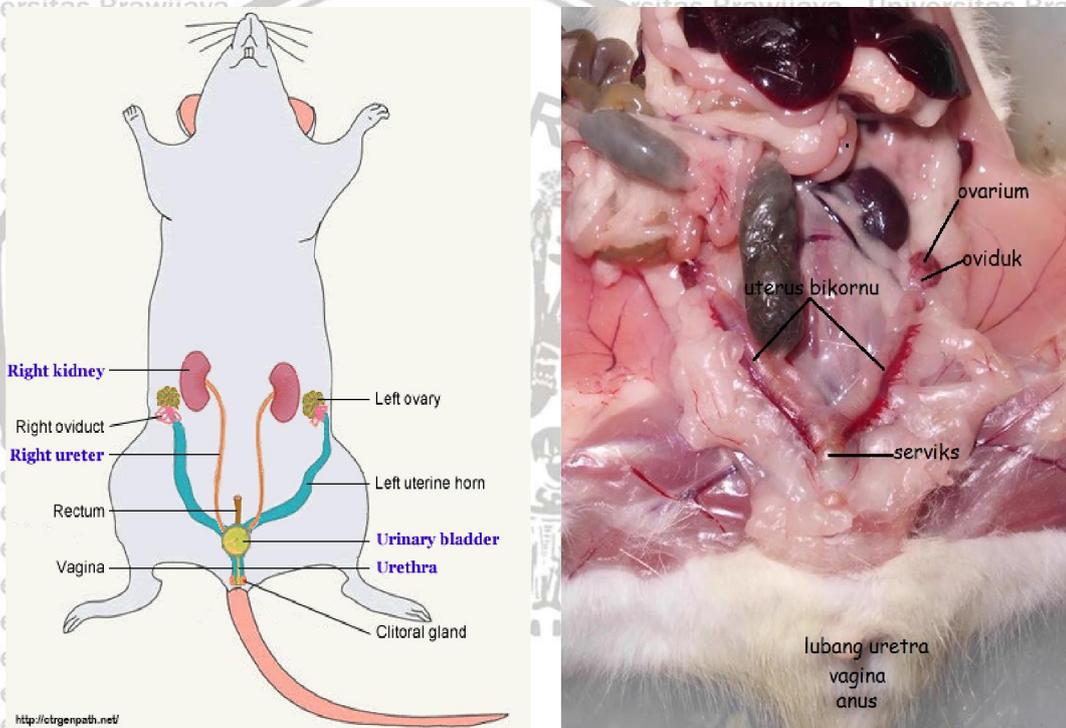
Tikus putih mempunyai keutamaan sebagai hewan coba yang sering digunakan untuk penelitian. Dipilihnya hewan coba ini dikarenakan berkembangnya mudah dan cepat, ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan mencit, mudah dipelihara walaupun dalam jumlah banyak. Ciri-cirinya berwarna putih albino, kepala kecil dengan ekor yang panjang melebihi badannya, lebih jinak, kemampuan menyusui lebih tinggi. Ada tiga macam tikus putih yang sering digunakan dalam setiap penelitian diantaranya *Sprague Dawley*, *Long Evans*, dan *Wistar* (Akbar, 2010).

Klasifikasi hewan coba ini adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
 Kelas : Mammalia
 Ordo : Rodentia
 Subordo : Odontoceti
 Familia : Muridae
 Genus : *Rattus*
 Spesies : *Rattus norvegicus*

Rattus norvegicus merupakan hewan mamalia yang termasuk kedalam ovulator yang spontan. Ovulasi pada hewan ini terjadi pada pertengahan siklus estrus dikarenakan pengaruh akibat meningkatnya hormone LH. Tikus ini termasuk hewan yang bersifat poliestrus dan memiliki siklus reproduksi yang sangat pendek, isaran siklusnya antara 4 sampai 5 hari, ovulasinya sendiri berkisar antara 8 sampai 11 jam setelah dimulai tahap estrus. Folikel yang telah kehilangan telur akibat terjadinya ovulasi akan berubah menjadi korpus luteum yang kemudian akan menghasilkan progesteron. Progesteron mempunyai tugas dalam menyiapkan rahim agar reseptif saat implantasi embrio (Akbar, 2010).

Rahim merupakan sebuah saluran muskuler dan diperlukan untuk menerima ovum yang sudah dibuahi. Dinding rahim terdiri dari tiga lapisan antara lain : membran serosa yang merupakan lapisan paling luar yang membungkus uterus yang terdiri dari jaringan ikat. Kemudian miometrium, ini adalah lapisan kedua yang terdiri dari otot polos yang mengandung pembuluh darah dan limfa. Lapisan yang terakhir adalah endometrium, ini merupakan tempat penempelan embrio bagi menci yang hamil. Bagi menci yang tidak hamil endometrium adalah selaput lendir yang terdapat kelenjar dan pembuluh darah (Akbar, 2010).



Gambar 2.6 Gambar alat reproduksi tikus betina

Ada 4 fase yang terdapat pada tikus yaitu fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Caligioni, 2010).

Pada proestrus, sel pada lapisan endometrium berkembang menjadi lebih besar dan tinggi ke arah kolumnar epitel. Sering terjadi mitosis dengan degenerasi sel epitel (kemunculan degenerasi sel epitel endometrium yang menonjol

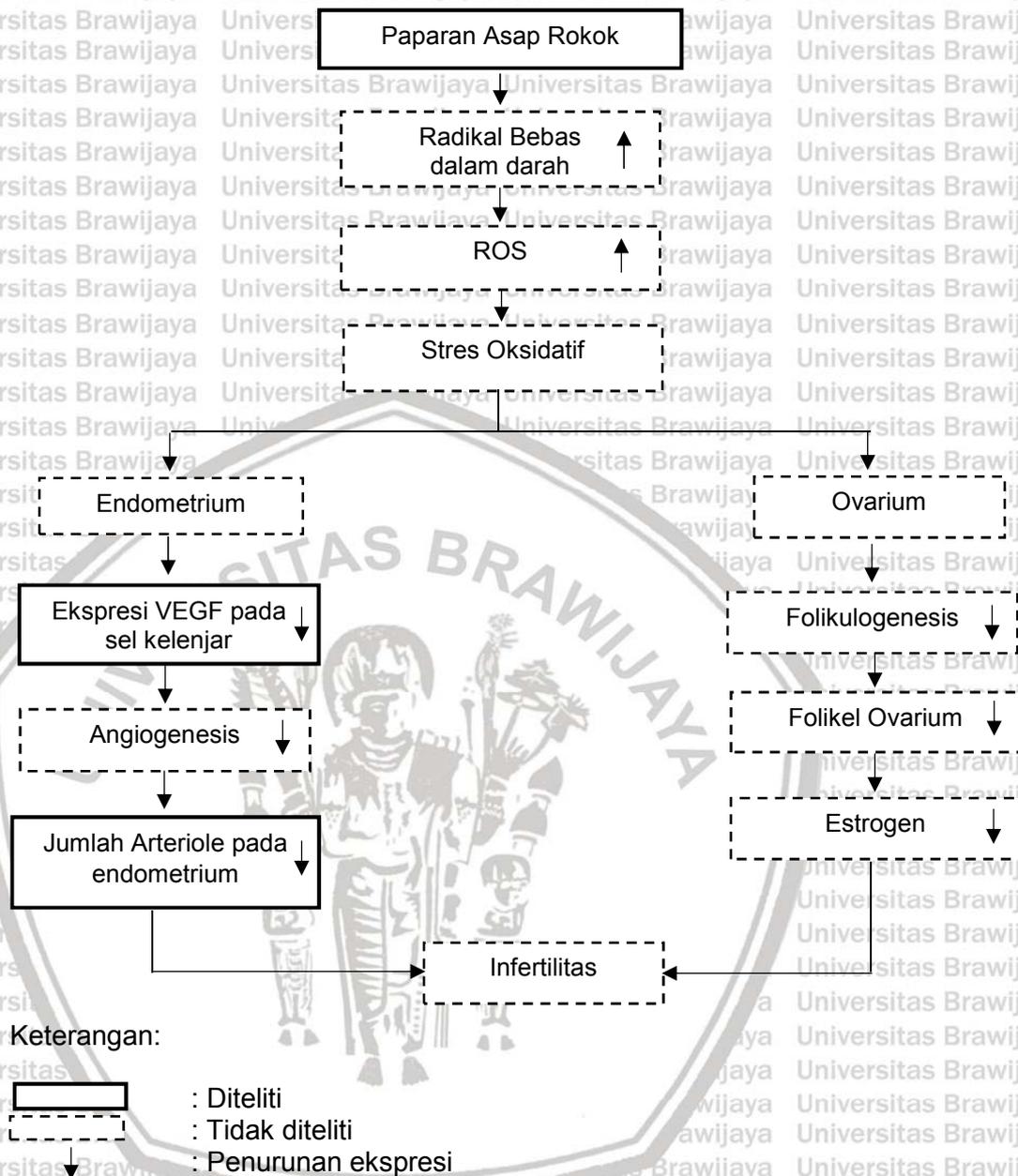
menandai akhir proestrus atau awal estrus) dan infiltrasi sel inflamasi kecil (Westwood, 2008).

Perubahan epitel endometrium menentukan awalnya fase estrus, dengan munculnya degenerasi seluler atau nekrosis di kelenjar terlebih dahulu yang diikuti oleh lapisan epitel. Hal ini disertai dengan hilangnya aktivitas mitosis dan infiltrasi leukosit. Dilatasi luminal mungkin berlanjut pada akhir fase estrus, meskipun hal ini umumnya tidak terjadi. Beberapa aktivitas mitosis endometrium epitel kembali pada akhir estrus (Westwood, 2008).

Selama fase metestrus, epitel endometrium uterus menunjukkan degenerasi vakuolar yang berlanjut, namun juga ditandai dengan aktivitas mitosis, sehingga keduanya terlihat bersamaan, terdapat juga infiltrasi leukosit variabel (Westwood, 2008).

Pada awal fase diestrus korpus luteum bekerja secara maksimal, tetapi terjadi pengecilan rahim, dan tidak memiliki pembuluh darah yang menonjol dan umumnya menunjukkan lumen seperti celah. Mereka dilapisi oleh epitel cuboidal atau kolumnar rendah yang menunjukkan degenerasi sel. Terjadi sedikit mitosis pada awal tahap ini dan kelenjarnya sangat tidak aktif, namun ada beberapa peningkatan aktivitas selama fase perkembangan. Juga, menjelang akhir fase, dapat dilihat sedikit edema stroma yang berdekatan dengan epitel endometrium (Westwood, 2008).

2.13 Kerangka Teori



Gambar 2.7 Kerangka Teori Pengaruh Ekstrak etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Asap rokok.

Keterangan Kerangka Teori

Asap rokok mengandung sekitar 10 molekul oksidan per batangnya. Radikal bebas dari asap rokok juga menyebabkan peroksidasi dari asam lemak ganda tak

jenuh membran sel yang memperkuat stres oksidatif selama merokok. Stres oksidatif dapat dilihat dari beberapa tanda yang berbeda, juga dengan pengukuran langsung agen oksidatif seperti produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh sel darah perifer, atau dengan efek stres oksidatif pada target molekul (produk lipid peroksida dan protein teroksidasi), atau respon kapasitas antioksidan dalam plasma. Terpaparnya dengan rokok dikaitkan dengan penurunan antioksidan didalam tubuh. Studi yang pernah dilakukan mengatakan bahwa asap rokok mengakibatkan penurunan konsentrasi antioksidan dalam plasma.

Asap rokok dapat memicu stres oksidatif pada responden, stres oksidatif tersebut dapat mengakibatkan terjadinya gangguan pada organ reproduksi wanita. Mekanisme yang terjadi meliputi efek toksik langsung pada sel ovum, gangguan pada saluran reproduksi dan imunitas, sehingga mengakibatkan infeksi pada tuba fallopi. Karbonmonoksida dalam asap rokok mampu menembus plasenta lalu mengikat Hb janin. Hal ini dapat menyebabkan kekurangan oksigen dalam hemoglobin yang mengakibatkan kekurangan oksigen pada janin.

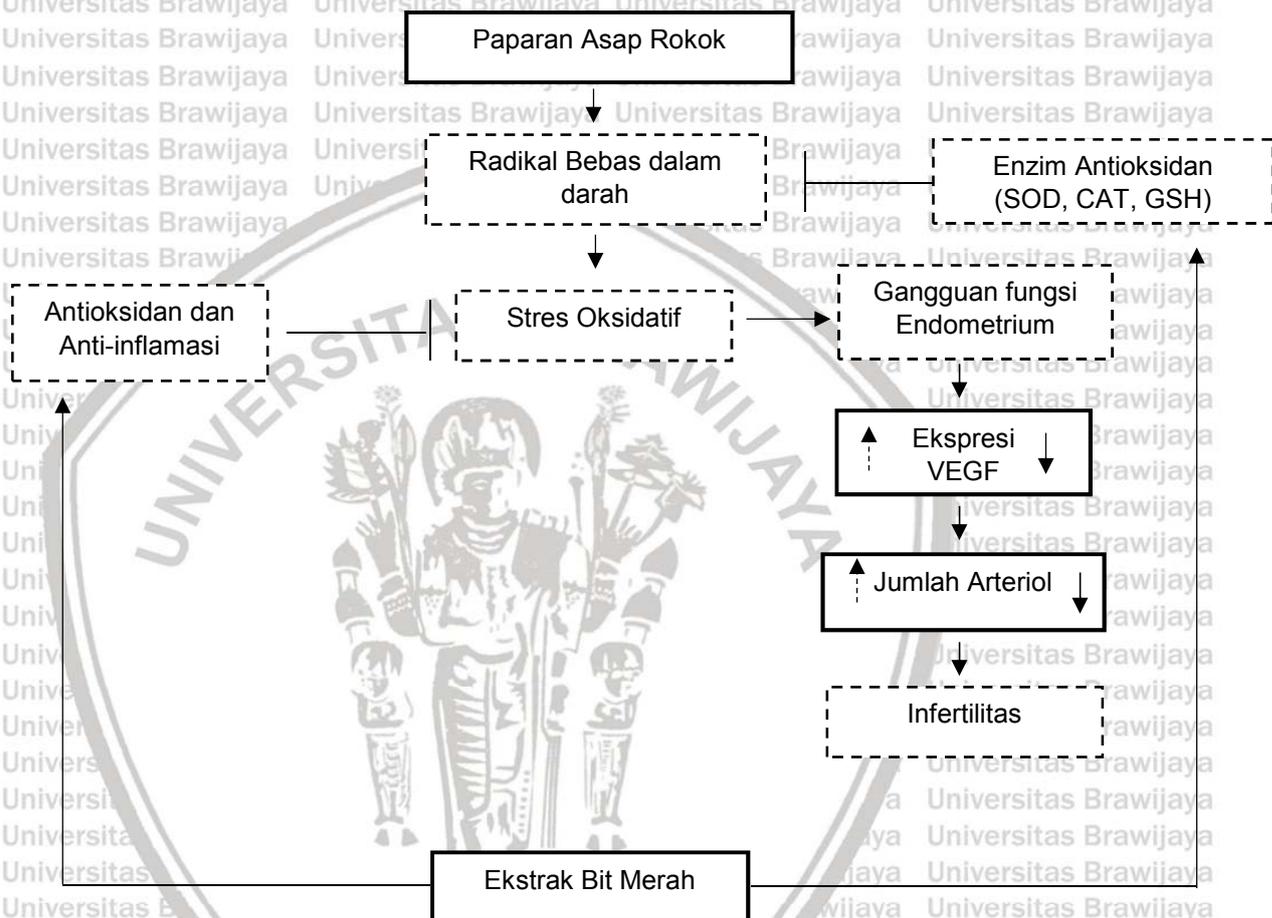
Radikal bebas yang dihasilkan oleh asap rokok dapat menyebabkan penurunan estrogen yang mengakibatkan berkurangnya hasil dari suatu folikel. Estrogen meregulasi VEGF yang berfungsi menginduksi peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan angiogenesis. Peran penting dalam siklus menstruasi dipegang oleh estrogen. Rendahnya estrogen juga berpengaruh terhadap regulasi VEGF sehingga menghambat proses proliferasi pada siklus menstruasi diendometrium. Didalam tubuh terdapat antioksidan endogen enzimatik yaitu SOD, CAT dan GSH yang bekerja menghambat radikal bebas.

Untuk menetralsir radikal bebas dalam tubuh, maka perlu adanya antioksidan dari bahan makanan seperti ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L.*), diharapkan dengan pemberian ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan pertumbuhan jumlah arteriole pada endometrium.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Pengaruh Estrak etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Asap Rokok.

Keterangan Kerangka Konsep

Paparan asap rokok diketahui dapat meningkatkan stres oksidatif dalam tubuh melalui berbagai mekanisme, termasuk penurunan antioksidan. Stres oksidatif merupakan reaksi *Reactive Oxygen species* (ROS) dengan tingkat pertahanan yang lebih tinggi dan bersifat toksik dibandingkan dengan antioksidan yang terdapat dalam tubuh. Paparan asap rokok yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dengan meningkatnya ROS dapat menyebabkan penurunan ekspresi VEGF oleh sel epitel yang kemudian menghambat VEGF sebagai kelangsungan hidup sel endotel. VEGF merupakan faktor pertumbuhan yang penting untuk proses proliferasi pada endometrium, proses tersebut bertujuan untuk perkembangan normal terhadap endometrium selama siklus reproduksi dan implantasi, sehingga apabila terjadi hambatan pertumbuhan pembuluh darah yang baru (angiogenesis), maka akan terjadi hambatan pertumbuhan pembuluh darah yang berakibat pada kelainan siklus menstruasi, amenorea, serta kegagalan nidasi hasil konsepsi.

Buah bit merah (*Beta vulgaris L.*) berfungsi sebagai antioksidan dan dapat membantu mencegah infeksi dalam tubuh. Bit merah memiliki senyawa polifenol, betalain, flavonoid, asam folat dan vitamin. Antioksidan terdapat banyak dalam senyawa betalain, yang merupakan suatu pigmen berwarna merah pada buah bit, betalain juga memiliki antioksidan yang tinggi dan berguna untuk mengendalikan radikal bebas dalam tubuh.

Dengan pemberian ekstrak bit merah, diharapkan dapat menurunkan stres oksidatif dalam tubuh yang berpengaruh terhadap penurunan ekspresi VEGF dan Jumlah arteriole endometrium.

3.2 Hipotesis Penelitian

a. Hipotesis Umum

Ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) berpengaruh terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

b. Hipotesis Khusus

- 1) Paparan asap rokok dapat menurunkan ekspresi VEGF pada endometrium tikus.
- 2) Paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah arteriole pada endometrium tikus.
- 3) Pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan ekspresi VEGF pada tikus yang dipapar asap rokok.
- 4) Pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.
- 5) Ada hubungan antara dosis dan efek bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan peningkatan VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan mengikuti Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau rancangan *post test only control group*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pemeliharaan tikus dan pembedahan, Laboratorium Biomedik FKUB untuk pemeriksaan Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada endometrium tikus dan Laboratorium Patologi Anatomi FKUB untuk pemeriksaan jumlah arteriole pada endometrium tikus. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai dari bulan Januari sampai Maret 2018, yang terbagi dalam 3 tahap, yaitu 1 minggu untuk aklimatisasi, 8 minggu (56 hari) untuk perlakuan dan dilanjutkan dengan analisis data.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa hewan coba tikus putih dengan jenis kelamin betina (*Rattus novvergicus strain wistar*) sebanyak 25 ekor. Tikus dipesan melalui petugas Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Alasan diambil tikus putih dalam penelitian ini karena diketahui dengan jelas bentuk organ, fungsi, proses biokimia dan biofisik yang memiliki kemiripan dengan manusia, serta mudah dipelihara dan merupakan hewan yang sehat dan cocok untuk digunakan dalam penelitian ini.

Kriteria inklusi:

a. Tikus *strain wistar*

- b. Jenis kelamin betina
- c. Usia tikus 2 bulan (Usia reproduksi)
- d. Berat badan 150-200 gram
- e. Kondisi sehat

Kriteria eksklusi:

- a. Hewan coba sakit sebelum perlakuan
- b. Adanya kelainan anatomi
- c. Jika hewan coba mati saat penelitian berlangsung

Besar sampel dalam tiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Hanafiah (2012).

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

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

Penelitian ini menggunakan 5 kelompok perlakuan, dengan masing-masing sampel per kelompok:

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19 : 4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Didapatkan jumlah sampel hewan coba untuk setiap kelompok yaitu berjumlah 5 ekor tikus. Tetapi disediakan tikus cadangan untuk setiap kelompok masing-masing 1 ekor tikus untukantisipasi apabila ada tikus yang mati saat adaptasi dan perlakuan.

4.4 Bahan dan Alat

4.4.1 Bahan

a. Bahan perlakuan untuk hewan coba

1) Paparan asap rokok yang diberikan pada tikus betina (*Rattus novergicus*) diperoleh dari rokok kretek tanpa filter yang memiliki kandungan nikotin 2,90 mg/batang dan tar 44,30 mg/batang, dengan paparan 2 batang rokok per hari dan diberikan selama 56 hari (8 minggu) dan terbukti memiliki pengaruh terhadap fungsi endometrium yang dapat menurunkan tingkat kesuburan. Proses pemaparan asap rokok menggunakan alat *smoking pump* pada Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, yang terbuat dari *fibreglass* dengan ukuran 26x36x12 cm. Alat ini memiliki klep yang berfungsi untuk masuk dan keluarnya asap rokok selama proses pemaparan.

2) Dosis bit merah yang digunakan yaitu 125 mg/kgBB/hari, 250 mg/kgBB/hari dan 500 mg/kgBB/hari.

3) Aquades

b. Perlengkapan pemeliharaan hewan coba

Kandang yang digunakan dari bahan ember plastik ukuran 40x20x12 cm dengan alas sekam, kawat jaring sebagai penutup ember, botol tempat minum hewan coba.

c. Bahan untuk pengambilan organ

Ketamin untuk pembiusan, formalin 10% untuk mengawetkan organ endometrium.

d. Bahan untuk swab vagina

Methylin Blue, alkohol, NaCL 0,9 %.

e. Bahan untuk pembuatan slide histopatologi

Formalin 10%, air kran, Sodium klorida (NaCl), xylon, parafin cair, etanol (70%, 80%, 90%, 100%), alkohol asam 1%, amonia air, cat Haris Hemotoksilin, cat eosin 1%.

f. Bahan untuk pengukuran ekspresi VEGF

Jaringan endometrium tikus, larutan PBS, larutan Sodium Sitrat Buffer, deparafinasi (Xilon, ethanol absolute, ethanol 90%, ethanol 80%, ethanol 70%, aquades steril), antigen retrevel dengan buffer sitrat, H2O2 3% dalam methanol, triton 0.25%, FBS 5%, Antibody primer Anti-Vascular Endothel Growth Factor, Antibody sekunder, SA-HARP (Streptavidin Horseradish Peroxidase), Cromagen DAB (Diaminobenzidine), Mayer's hematoxilen.

g. Bahan untuk pemeriksaan jumlah arteriole (pembuluh darah)

Jaringan endometrium tikus, aceton, xylon, mikrotan Rotali, es balok, waterbath, alkohol 96%, eosin.

h. Bahan untuk pemeliharaan hewan coba

- 1) Pakan hewan coba adalah makanan ternak yang diproduksi oleh PT. Japfa Comfeed Indonesia, tbk Buduran Sidoarjo yang sesuai dengan *Standart Operasional Procedur (SOP)*, berbentuk pellet yang dicampur tepung terigu dan air matang agar konsistensinya tidak keras (Lab. Farmakologi FKUB).
- 2) Air minum yang diberikan untuk hewan coba adalah air kran yang diberikan peroral (*ad libitum*).

4.4.2 Alat

a. Alat penimbang berat badan hewan coba menggunakan *Neraca Ohaus*.

b. Alat untuk pemberian ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L.*) menggunakan spuit 1 cc dan sonde.

c. Alat untuk pengambilan jaringan uterus.

Stoples kaca tertutup, alat untuk bedah minor (pinset, scalpet, gunting), papan untuk meja pembedahan

d. Alat untuk pewarnaan preparat ulas vagina.

Objek glass, cover glass dan mikroskop

e. Alat untuk pengambilan organ endometrium tikus

Stoples kaca tertutup, kapas yang dibasahi eter untuk anastesi, alat bedah (scalpet, pinset, gunting), tabung sebagai tempat penyimpanan organ sementara sebelum dibuat preparat hispatologi.

4.5 Proses Ekstraksi Bit Merah (*Beta vulgaris L.*)

4.5.1 Pembuatan ekstrak bit dengan menggunakan etanol

Ekstrak buah bit dilakukan di UPT Materia Medika yang terletak di Jl.Lahor No. 87 Kota Batu Malang Jawa Timur. Buah bit yang dipilih adalah buah bit yang tidak busuk berjumlah 15 kilogram, kemudian dilakukan pencucian hingga bersih dan dilakukan penjemuran diluar ruangan sehingga terkena cahaya matahari yang bertujuan agar buah bit yang dikeringkan bebas dari air. Setelah kering, bit tersebut di blender hingga halus dan didapatkan hasil 935 gram. Kemudian proses ekstraksi dilakukan dilaboratorium farmakologi fakultas kedokteran Universitas Brawijaya. Untuk ekstraksi buah bit merah digunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu kamar (Hukmah, 2007).

Bahan yang digunakan yaitu buah bit kering (simplisia) seberat 500 gram dan pelarut etanol 90% (900 ml). Prosesnya dilakukan secara bertahap yaitu bit kering (simplisia) diambil sebanyak 100 gram dan pelarut etanol sebanyak 900 ml, lalu dilakukan proses maserasi hingga selesai sampai mendapatkan ekstrak

bit merah berupa pasta. Kemudian hal yang sama dilakukan kembali sampai simplisia yang berjumlah 500 gram diolah menjadi ekstrak bit merah.

Alat yang digunakan terdiri dari timbangan analitik, pengaduk, gelas beker, kertas saring *whatman*, vacuum oven dan botol kaca.

Langkah kerja:

Buah bit kering yang telah menjadi serbuk dimasukkan kedalam gelas beker ukuran 1 liter air. Tuangkan pelarut etanol dengan perbandingan 1 : 9 (100 gram serbuk buah bit dan 900 ml etanol 96%). Kemudian campuran tersebut dikocok selama 30 menit lalu biarkan selama 1 malam pada suhu ruangan sehingga mengendap. Saring bahan yang telah tercampur untuk memperoleh campuran pelarut dan zat aktif dengan menggunakan kertas saring *whatman* no 40. Kemudian lanjutkan dengan proses evaporasi, dimana campuran pelarut dan zat aktif yang telah disaring sebanyak 1 liter dimasukkan kedalam labu kemudian dipasang pada evaporator. Isi *water bath* hingga penuh kemudian atur suhu hingga 90°C. Tunggu sampai larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi. Tampung pelarut kedalam labu penampung hingga terpisah dengan zat aktif ($\pm 1,5$ sampai 2 jam) sebanyak ± 900 ml. Hasil ekstraksi yang didapat melalui proses maserasi berjumlah 77 gram, kemudian masukkan kedalam botol plastik dan simpan pada suhu ruangan.

4.5.2 Kebutuhan Ekstrak Bit Merah

Perhitungan kebutuhan ekstrak bit merah (*Beta vulgaris L.*) untuk setiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

a. Kelompok Perlakuan 1 (P1)

Dosis : 125 mg/kgBB/hari

Berat tikus : 150 gram (berat yang digunakan adalah berat rata-rata)

Kebutuhan dosis per hari untuk masing-masing tikus :

$125 \text{ mg} \times (150 \text{ gram}/1000) \times 6 \text{ ekor tikus} = 112,5 \text{ mg}/\text{kelompok}/\text{hari}$.

112,5 mg ekstrak dilarutkan kedalam 3 cc aquades, kemudian diberikan dengan menggunakan sonde sebanyak 0,5 cc/tikus/hari.

b. Kelompok Perlakuan 2 (P2)

Dosis : 250 mg/kgBB/hari

Berat tikus : 150 gram

Kebutuhan dosis per hari masing-masing tikus :

$250 \text{ mg} \times (150 \text{ gram}/1000) \times 6 \text{ ekor tikus} = 225 \text{ mg/kelompok/hari.}$

225 mg ekstrak dilarutkan kedalam 6 cc aquades, kemudian diberikan dengan menggunakan sonde sebanyak 1 cc/tikus/hari.

c. Kelompok Perlakuan 3 (P3)

Dosis : 500 mg/kgBB/hari

Berat tikus : 150 gram

Kebutuhan dosis per hari masing-masing tikus :

$500 \text{ mg} \times (150 \text{ gram}/1000) \times 6 \text{ tikus} = 450 \text{ mg/kelompok/hari.}$

450 mg ekstrak dilarutkan kedalam 12 cc aquades, kemudian diberikan dengan menggunakan sonde sebanyak 2 cc/tikus/hari.

4.5.3 Pemberian Ekstrak Bit Merah

Jumlah cairan suspensi ekstrak bit merah yang diberikan untuk setiap hewan coba adalah :

a. Kelompok P1

$125 \text{ mg} \times (150 \text{ gr}/1000) \times 6 \text{ tikus} = 112,5 \text{ mg/kelompok/hari.}$

112,5 mg ekstrak dilarutkan dengan 3 cc aquades.

Masing-masing tikus diberikan 0,5 cc/tikus/hari, dibagi dalam 2 kali pemberian.

Pagi : 0,25 cc

Sore : 0,25 cc

b. Kelompok P2

$250 \text{ mg} \times (150 \text{ gr}/1000) \times 6 \text{ tikus} = 225 \text{ mg/kelompok/hari.}$

225 mg ekstrak dilarutkan dengan 6 cc aquades.

Masing-masing tikus diberikan 1 cc/tikus/hari, dibagi dalam 2 kali pemberian.

Pagi : 0,5 cc

Sore : 0,5 cc

c. Kelompok P3

$500 \text{ mg} \times (150 \text{ gr}/1000) \times 6 \text{ tikus} = 450 \text{ mg/kelompok/hari}$.

450 mg ekstrak dilarutkan dengan 12 cc aquades.

Masing-masing tikus diberikan 2 cc/tikus/hari, dibagi dalam 2 kali pemberian.

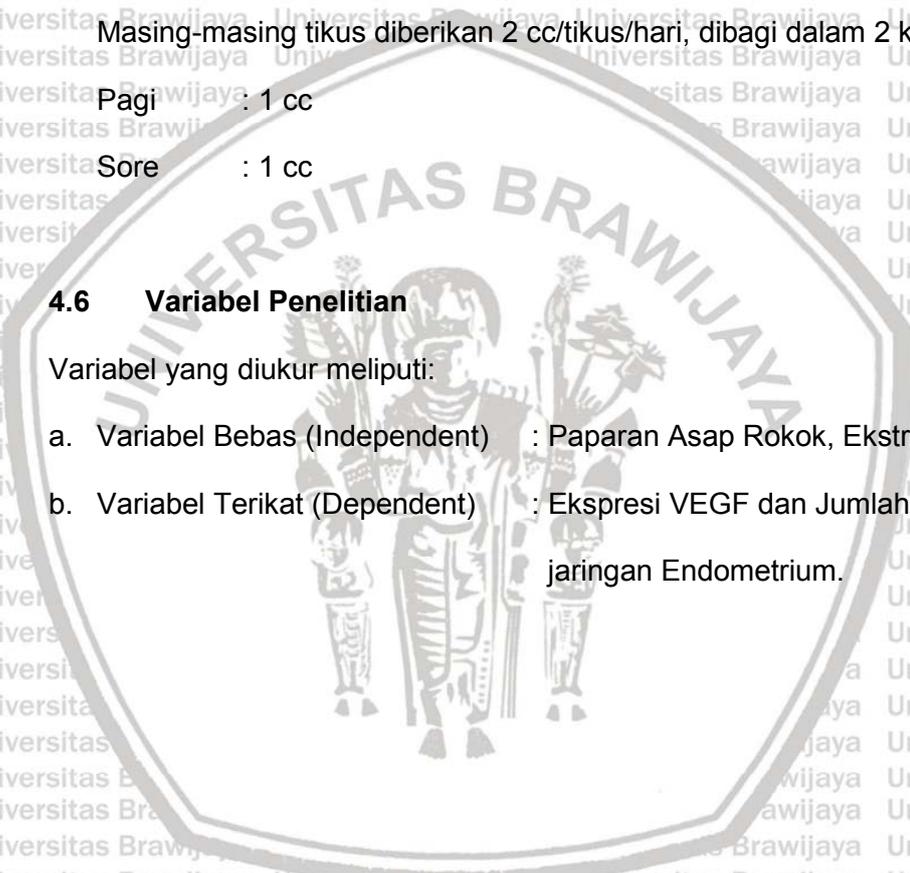
Pagi : 1 cc

Sore : 1 cc

4.6 Variabel Penelitian

Variabel yang diukur meliputi:

- a. Variabel Bebas (Independent) : Paparan Asap Rokok, Ekstrak Bit Merah.
- b. Variabel Terikat (Dependent) : Ekspresi VEGF dan Jumlah Arteriole di jaringan Endometrium.



4.7 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi Operasional | Satuan | Skala Ukur |
|---------------------------------|--|--|------------|
| Ekstrak etanol Bit Merah | Buah bit merah (<i>Beta vulgaris L.</i>) adalah hasil dari proses ekstraksi menggunakan etanol 96% yang mengandung senyawa betalain, yang diberikan per oral dengan menggunakan sonde. Dosis yang diberikan adalah 125 mg/tikus/hari, 250 mg/tikus/hari, 500 mg/tikus/hari (Clifort <i>et al.</i> , 2015). | mg/kgBB/hari | Rasio |
| Ekspresi VEGF | Rata-rata jumlah sel endotel yang mengekspresikan VEGF pada endometrium tikus dihitung dengan menggunakan aplikasi selkon. VEGF diperiksa dengan metode <i>Immunohistochemistry</i> (IHC) menggunakan antibody sekunder Biocare Medical VEGF (JH121) : sc-57496 | Jumlah sel/lapang pandang | Rasio |
| Jumlah Arteriole | Jumlah Arteriole pada sediaan jaringan endometrium dihitung dengan aplikasi selkon. Pemeriksaan jumlah arteriole menggunakan pewarnaan <i>Haematoksilin Eosin</i> (HE). | Bentuk bulat dan ketebalan jaringan/lapang pandang | Rasio |
| Paparan Asap Rokok | Asap rokok diberikan selama 8 minggu atau 56 hari dengan menggunakan <i>smoking pumps</i> sebanyak 2 batang/hari yang diberikan 1 batang pagi hari dan 1 batang sore hari (Widodo dkk, 2011). | Batang/hari | Rasio |

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Aklimatisasi Tikus

Adaptasi tikus dilakukan selama 7 hari yang bertujuan untuk menyesuaikan tempat baru bagi hewan coba tersebut. Ini dilakukan agar

mengurangi rasa stress pada tikus. Tikus tetap berada dalam kandang tanpa diberikan perlakuan, tetapi tikus tetap diberi makan (40 gr/hari) dan minum (150 ml/ekor). Tikus harus diletakkan pada suhu ruangan.

4.8.2 Prosedur apusan vagina dan pemeriksaan fase proestrus pada hewan coba

Pembuatan preparat apusan vagina dilakukan dengan cara mengambil cairan vagina pada lokasi kira-kira 5 cm dari vulva menggunakan cotton bud steril yang dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9%. Hasil usapan dioleskan pada gelas objek dan preparat difiksasi dengan alkohol 70% selama 5 menit, diwarnai dengan Giemsa 3 % dan dibiarkan selama dua menit. Preparat selanjutnya dicuci dengan aquades dan dibiarkan kering. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40 kali (Harlis, 2014).

4.8.3 Pembagian Kelompok

Tikus dengan jumlah 30 ekor dikelompokkan menjadi 5 kelompok, dan setiap kelompok tikus berjumlah 6 ekor:

- a. Kelompok 1/ Kontrol negatif (-) merupakan kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok dan tidak diberikan ekstrak bit merah.
- b. Kelompok 2/ Kontrol positif (+) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang yaitu pagi 1 batang sore 1 batang dan tidak mendapat ekstrak bit merah.
- c. Kelompok 3 (PI) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang yaitu pagi 1 batang sore 1 batang dan ekstrak bit merah 125 mg/kgBB/hari selama 8 minggu (56 hari).
- d. Kelompok 4 (PII) merupakan kelompok tikus yang dipapar asap rokok 2 batang yaitu pagi 1 batang sore 1 batang dan ekstrak bit merah 250 mg/kgBB/hari selama 8 minggu (56 hari).

e. Kelompok 5 (P111) merupakan kelompok yang dipapar asap rokok rokok 2 batang yaitu pagi 1 batang sore 1 batang dan ekstrak bit merah 500 mg/kgBB/hari selama 8 minggu (56 hari).

Paparan asap rokok dilakukan sebelum pemberian ekstrak bit merah selama 8 minggu (56 hari) yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bit merah setelah selesai dipapar asap rokok. Pengenceran ekstrak bit merah dilakukan dengan menggunakan aquades.

4.8.4 Prosedur Isolasi Sampel Jaringan Organ Endometrium

Tikus dibedah setelah 56 hari perlakuan dengan menggunakan langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Tikus dianestesi dengan cara disuntikkan ketamin 0.2 mg/tikus pada bagian paha tikus secara Intra Muscular (IM), kemudian tunggu beberapa menit sampai tikus tidak bergerak lagi.
- b. Kemudian tikus diletakkan pada papan dengan perut tikus menghadap ke bagian atas. Tikus diletakkan pada alas sebuah papan dengan menggunakan paku payung yang ditancap pada ke empat telapak kaki tikus. Dinding perut diinsisi dengan gunting dan dibuka dengan menggunakan pinset.
- c. Kemudian uterus diambil dengan dengan cara menggunting pada bagian isthmus tuba fallopi kiri dan kanan (yaitu bagian yang paling dekat dengan uterus) dan pada bagian ekor (batas antara serviks dan uterus).
- d. Uterus dibersihkan dari seluruh ligamen yang melekat. Kemudian uterus dibersihkan dari darah dengan menggunakan NaCL 0,9%, lalu tiriskan organ dengan menggunakan kertas saring dengan satu kali tekanan.
- e. Apabila air pada bagian organ mulai mengering, timbang uterus utuh dengan grade analitik dan selanjutnya dipisahkan antara tandur uterus kiri dan kanan.
- f. Kemudian masukkan kedalam tempat yang berisi larutan *Fixative buffer formalin* 10% dan direndam selama 12-24 jam.

g. Organ kemudian dibawa untuk diproses menjadi preparat di Laboratorium patologi anatomi untuk pemeriksaan jumlah arteriole dan di Laboratorium Biomedik untuk pemeriksaan ekspresi VEGF.

h. Bangkai tikus yang tersisa dan tidak digunakan lagi dikubur dengan baik supaya tidak terjadi pencemaran lingkungan.

4.8.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Endometrium

Pembuatan preparat histopatologi pada endometrium terdiri dari fiksasi, dehidrasi, pembenangan, blocking, pemotongan jaringan (sectioning), pewarnaan, perekatan (mounting) dan pelabelan (labeling). Berikut adalah langkahnya:

a. Organ uterus yang telah dipisahkan terlebih dahulu antara tandur kiri uterus dan tandur kanan diisolasi dengan menggunakan larutan buffer formalin 10% (fiksasi) selama 1 jam dengan tujuan mengawetkan jaringan, lalu cuci dengan air yang mengalir selama 15 menit, dan diulang sebanyak dua kali.

b. Dehidrasi uterus dengan cara direndam menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat yaitu pada konsentrasi 70%, lalu pindahkan dalam alkohol 80%, kemudian dalam alkohol 90% dan 95%, lakukan pengulangan dua kali dalam 1 jam.

c. Proses penjernihan, gunanya untuk menarik alkohol dengan memakai larutan xylene I dalam waktu 1,5 jam.

d. Kemudian lakukan proses pengeluaran cairan clearing karena cairan ini dapat menyebabkan jaringan mudah rontok sehingga jaringan harus di *embedding* dengan menggunakan paraffin.

e. Selanjutnya dilakukan blocking dengan paraffin lunak pada suhu 42°C-46°C, biarkan mengeras dan masukkan kedalam freezer selama dua kali dalam 1 jam.

f. Selanjutnya tahap pemotongan (sectioning), dimana blok paraffin yang mengandung jaringan endometrium yang sudah mengeras dipotong dengan tingkat ketebalan 4-5 μm menggunakan pisau mikrotom.

g. Uterus tandur kiri dan kanan dipotong secara melintang, lalu dimasukkan kedalam water bath 40°C. Hasil pemotongan diangkat dengan objek glass dengan posisi tegak lurus lalu dikeringkan.

h. Hasil pemotongan endometrium dilakukan pewarnaan dengan HE (Hematoksilin Eosin). Langkahnya sebagai berikut:

- 1) Rendam preparat kedalam larutan xylene 2 kali masing-masing selama 10 menit.
- 2) Hidrasi diambil dari alkohol absolute 2 kali masing-masing selama 2 menit.
- 3) Lalu preparat diangkat dari alkohol absolute dan lanjut perendaman dalam alkohol 95% selama 2 menit.
- 4) Selanjutnya rendam dalam alkohol 90% selama 2 menit.
- 5) Lalu pindahkan kedalam larutan alkohol 80% selama 2 menit.
- 6) Kemudian pindahkan lagi kedalam larutan alkohol 70% selama 2 menit, selanjutna distilasi dengan air selama 3 menit.
- 7) Inkubasi dalam larutan Hematoksilin Mayers dan cuci dengan air mengalir selama 15-20 menit.
- 8) Kemudian counterstaining dalam larutan Eosin solution selama \pm 2 menit.
- 9) Lalu dehidrasi pada alkohol dengan degradasi meningkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95% dan 100% masing-masing 2 menit.
- 10) Kemudian ambil preparat dan rendam dengan xylene III selama 2 menit, lalu pindahkan dalam xylene IV selama 2 menit.
- 11) Kemudian preparat diangkat dan dikeringkan.
- 12) Preparat kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali untuk melihat arteriole. Perhitungan jumlah arteriole

perlapang pandang dan diulang 10 kali lapang pandang. Untuk rata-rata jumlah arteriole perlapang pandang yaitu sekitar 3 sel.

i. Prosedur *Immunohistochemistry* (IHC) untuk penghitungan ekspresi VEGF pada endometrium dengan langkah sebagai berikut:

- 1) Lakukan proses Deparafinasi, dengan tujuan menghilangkan paraffin yang menempel pada jaringan yang ada pada slide.
- 2) Kemudian lakukan proses Antigen Retrivel dengan PBS, tujuannya untuk memperjelas epitop pada antigen sampai ke sel (jaringan).
- 3) Lalu tahap Immunohistokimia hari pertama: slide siap di IHC untuk Blocking endogen.
- 4) Hari kedua, lakukan inkubasi sekunder *antibody universal*, lalu inkubasi SA-HRP (Streptavidin Horseradish Peroxidase), kemudian dilanjutkan aplikasi cromagen DAB (Diaminobenzidine), setelahnya lakukan *counterstain* dengan *Mayer's Hematoxilen* (berwarna ungu).
- 5) Selanjutnya lakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Lakukan penghitungan kelenjar endometrium sel yang mengekspresi VEGF pada setiap lapang pandang dan diulang sebanyak 10 kali dengan cara menggeser lapang pandang. Sel yang positif mengekspresikan VEGF yang ditunjukkan pada sitoplasma sel kelenjar endometrium yang terwarnai coklat. Penghitungan jumlah sel dilakukan oleh 2 orang.

4.9 Teknik Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan berturut-turut antara lain:

- (1) uji normalitas data sampel dengan uji *Shapiro-Wilk* untuk data yang berskala rasio dan ukuran sampel kecil, (2) uji *Anova One Way* (uji F) untuk membandingkan lebih dari 2 kelompok sampel dan data terbukti berdistribusi

normal, (3) uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) (bila pada uji *Anova One Way* diperoleh H_0 ditolak) dengan menggunakan *LSD (Least Significant Different)*, (4) uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal, dan tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (*soft-ware*) *SPSS for Windows 23*. Secara lengkap dijelaskan di bawah ini.

4.9.1 Uji prasyarat parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik, hal ini dikarenakan semua data yang terukur menunjukkan skala data rasio. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik, maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik, yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan *p-value*. Jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan. Sedangkan jika nilai Sig atau *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santoso, 2005).

4.9.2 Uji *Anova One Way*

Pengujian dengan *Anova One Way* (uji *F*) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur pada lebih dari 2 kelompok sampel. Uji ini digunakan bila data berdistribusi normal, bila tidak berdistribusi normal maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Tujuan teknik analisis ini digunakan adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh perlakuan dari peneliti terhadap objek

sampel penelitian. Jika pada uji *Anova One Way* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) (Steel dan Torrie, 1995). Tujuan digunakan uji *LSD* adalah untuk menemukan pada dosis berapa yang mempunyai pengaruh yang paling bermakna.

4.9.3 Uji Korelasi

Uji korelasi tidak lain adalah menguji ada atau tidak adanya tingkat keeratan hubungan dua variabel terukur (minimal berskala interval), yaitu korelasi antar variabel respon. Dalam penelitian ini digunakan uji korelasi *Pearson* jika data berdistribusi normal, tetapi jika tidak maka digunakan uji *Spearman's rho*. Kriteria keputusan berdasarkan nilai Sig atau *p-value*, jika *p-value* > 0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang tidak bermakna antar dua variabel, dan jika *p-value* < 0.05 maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel.

Selanjutnya tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/KK) dapat diartikan ke dalam tujuh tingkatan (Hasan, 2012) sebagai berikut:

KK = 0, tidak ada korelasi.

$0 < KK \leq 0.20$, korelasi sangat rendah/lemah tapi pasti.

$0.20 < KK \leq 0.40$, korelasi rendah/lemah tapi pasti.

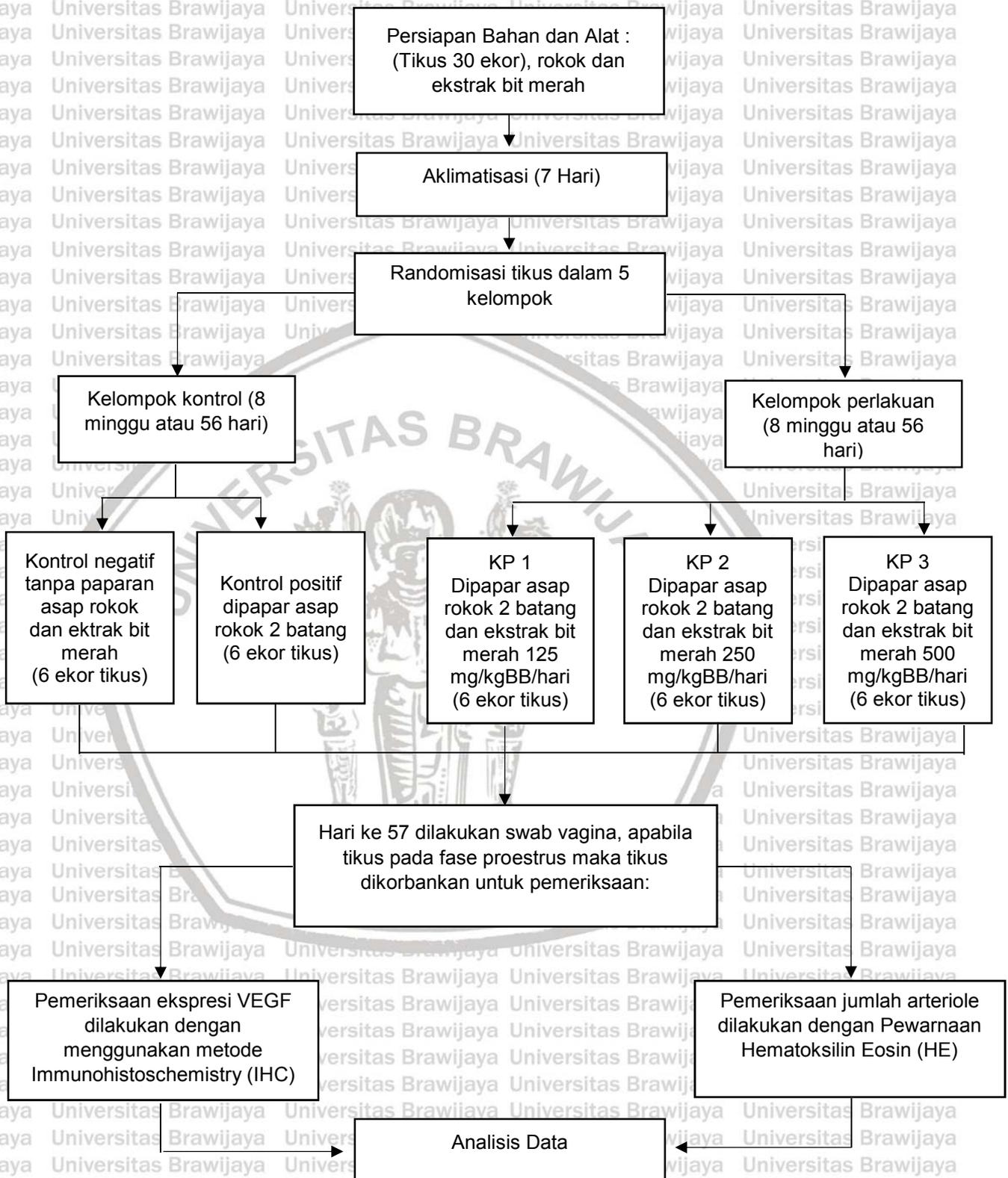
$0.40 < KK \leq 0.70$, korelasi yang cukup berarti.

$0.70 < KK \leq 0.90$, korelasi yang tinggi; kuat.

$0.90 < KK < 1.00$, korelasi sangat tinggi; kuat sekali, dapat diandalkan.

KK = 1, korelasi sempurna.

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Pengamatan Hewan Coba

Pada studi ini peneliti menggunakan hewan coba sebanyak 25 ekor, tetapi disetiap kelompok dilebihkan untuk cadangan masing-masing 1 ekor tikus. Tikus yang digunakan adalah tikus yang tidak bunting. Pada saat dilakukan aklimatisasi, ada beberapa tikus yang bunting dan kelompok langsung mengganti semua tikus guna untuk mencegah ada tikus lainnya yang bunting. Setelah tikus baru datang dilakukan kembali aklimatisasi selama 1 minggu, pada minggu tersebut peneliti juga menimbang berat badan tikus guna untuk melihat peningkatan berat badan tikus selama penelitian.

Sebelum dilakukan perlakuan, terlebih dahulu tikus diperiksa fase proestrus. Pada awal pemeriksaan, dari 30 ekor tikus yang swab vagina, terdapat 8 ekor tikus yang berada pada fase proestrus. Kemudian tikus yang proestrus langsung diberikan perlakuan paparan asap rokok dan pemberian ekstrak bit merah. Tikus yang belum proestrus tetap diberi makan dan minum. Hari berikutnya terdapat 6 ekor tikus yang proestrus, kemudian 7 ekor yang proestrus, lalu 4 tikus yang proestrus dan terakhir 5 tikus yang proestrus.



Tanda panah tersebut menunjukkan sel yang berada pada fase proestrus tikus yang ditandai dengan epitel berinti yang lebih banyak

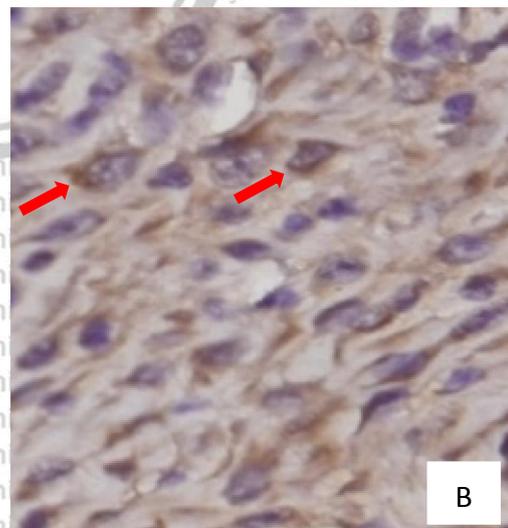
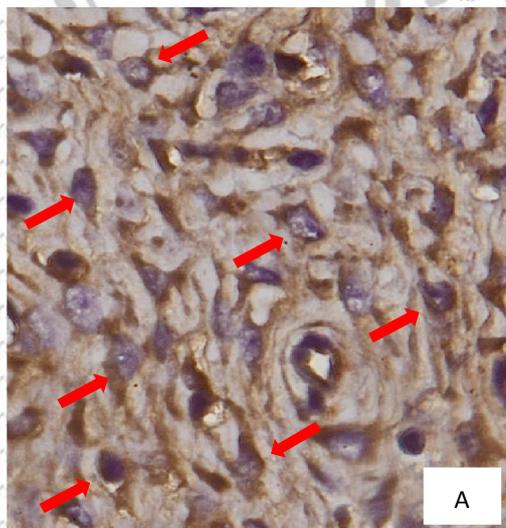
Gambar 5.1 Fase Proestrus pada tikus betina yang diamati dibawah mikroskop.

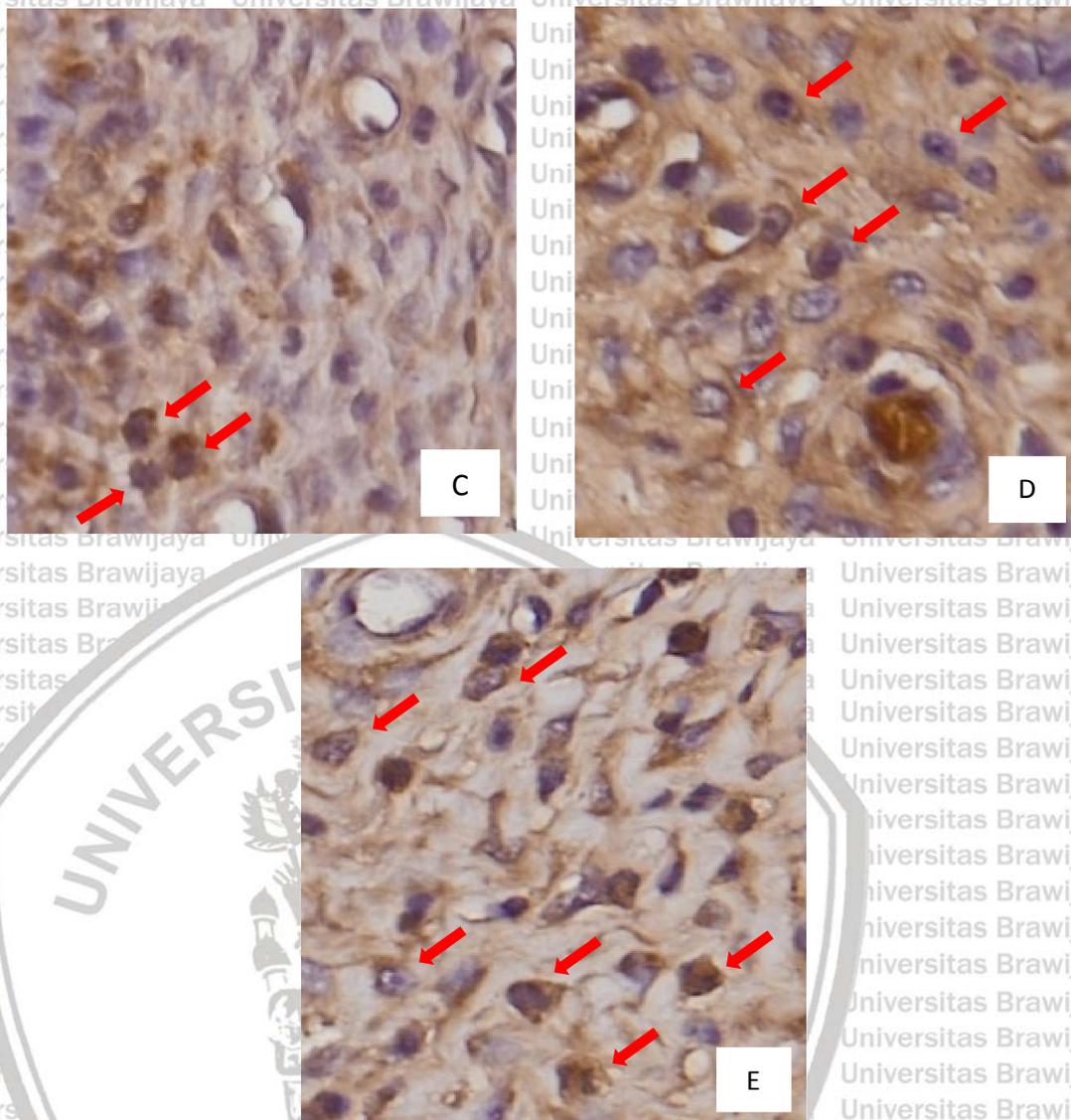
Pada awal dilakukan penelitian, ada beberapa tikus yang tidak menghabiskan pakan yang disiapkan dan tikus mengalami penurunan berat badan, ini dikarenakan akibat tikus terpapar dengan asap rokok, bulu tikus juga terlihat sedikit menguning. Setelah beberapa hari kemudian, pola makan tikus mulai normal kembali dan berat badan tikus mulai meningkat. Gerak tikus selama penelitian juga aktif, hanya saja setelah dilakukan paparan asap rokok gerak tikus kurang aktif.

Terdapat 1 tikus yang mati pada kelompok perlakuan 1 dan tikus tersebut kemudian tikus dikubur. Pada saat proses pembedahan, terdapat 1 tikus yang mengalami pembengkakan pada uterus, tikus tersebut merupakan kelompok tikus kontrol positif, dimana tikus tersebut hanya dipapar dengan asap rokok saja, dan tidak diberi ekstrak etanol bit merah. Tikus tersebut langsung di eksklusi dari kelompok kontrol positif.

5.2 Hasil Pengamatan ekspresi VEGF dan Jumlah arteriole pada endometrium tikus

Dibawah ini akan menampilkan gambar sel VEGF yang terekspresi ditandai dengan tanda panah.





Gambar 5.2 Jumlah sel kelenjar endometrium yang mengekspresikan VEGF pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah yang dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Keterangan: Gambar A (kontrol negatif atau tanpa perlakuan), gambar B (kontrol positif atau hanya dipapar asap rokok 2 batang/hari), gambar C (perlakuan I atau dipapar asap rokok 2 batang/hari kemudian diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari), gambar D (perlakuan II atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari), gambar E (perlakuan III atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dosis 500 mg/kgBB/hari).

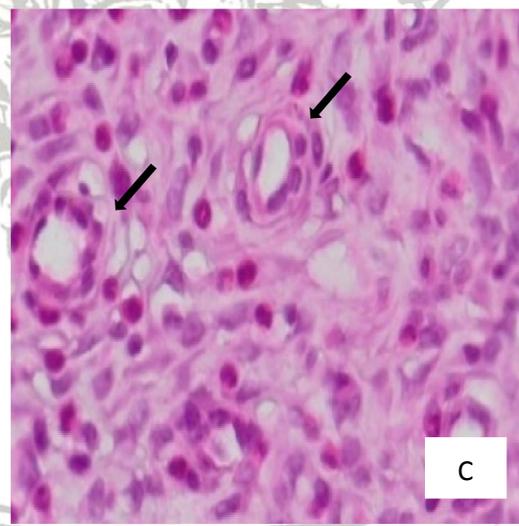
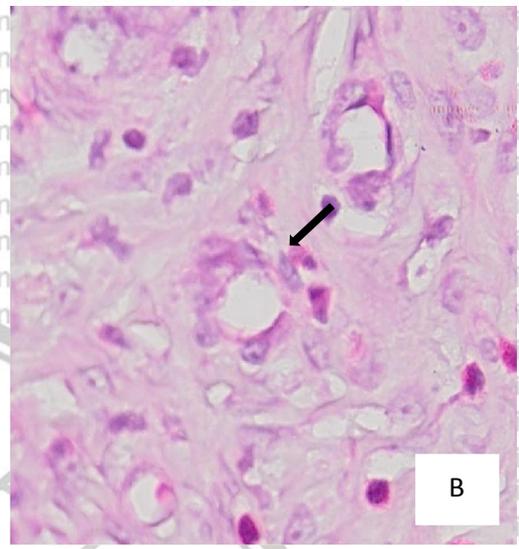
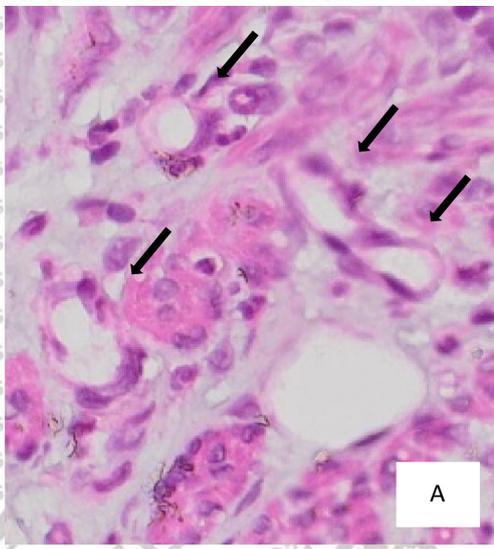
Sel VEGF yang terekspresi dihitung dengan menggunakan aplikasi selkon. Metode pemeriksaan menggunakan metode *Immunohistochemistry* (IHC) dan digunakan primary antibody bs-1665R. Sel VEGF yang terekspresi terlihat

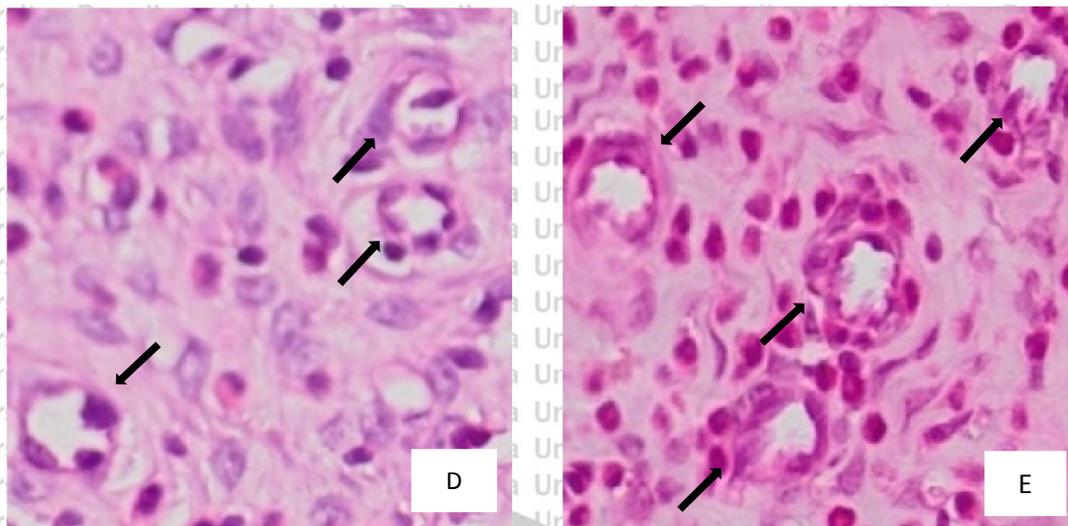
pada bagian stroma endometrium, yang ditandai dengan bagian sitoplasma yang berwarna coklat dan inti sel berwarna ungu kebiruan.

Tanda panah pada setiap gambar menunjukkan sel VEGF yang tereksresi. Pada gambar A, terdapat banyak sel yang tereksresi, gambar A tersebut merupakan kelompok kontrol negatif, dimana pada kelompok tersebut hewan coba tanpa diberi perlakuan. Pada gambar B, terlihat penurunan sel yang tereksresi, ini dikarenakan gambar B merupakan kelompok kontrol positif, dimana hewan coba tersebut hanya dipapar asap rokok sebanyak 2 batang/hari.

Pada gambar C, terlihat mulai terjadi peningkatan ekspresi VEGF, dimana gambar tersebut merupakan kelompok perlakuan I, pada kelompok tersebut hewan coba dipapar asap rokok 2 batang/hari, selang 2 jam diberikan ekstrak bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari. Pada gambar D, sel yang tereksresi mulai meningkat dibandingkan dengan gambar C, gambar D merupakan kelompok perlakuan II dimana tikus dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberikan ekstrak bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari. Pada gambar E, terdapat banyak sel yang tereksresi, gambar E merupakan kelompok P III dimana hewan coba dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari. Peningkatan sel yang tereksresi secara perlahan meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak bit merah yang diberikan kepada hewan coba.

Dibawah ini akan menampilkan gambar jumlah arteriole yang ditandai dengan tanda panah berikut:





Gambar 5.3 Arteriole pada kelenjar endometrium tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah yang dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali

Keterangan: Gambar A (kontrol negatif atau tanpa perlakuan), gambar B (kontrol positif atau hanya dipapar dengan asap rokok saja), gambar C (perlakuan I atau dipapar asap rokok 2 batang/hari lalu diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari), gambar D (perlakuan II atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari), dan gambar E (perlakuan III atau dipapar asap rokok 2 batang/hari dilanjutkan diberi ekstrak etanol bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari).

Untuk menilai atau menghitung jumlah arteriole pada endometrium dilakukan secara manual dikarenakan arteriole berukuran besar. Sebelumnya dilakukan pewarnaan *Haemotoxilin* dan *Eosin* terlebih dahulu. Arteriole dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Arteriole berbentuk bulat dan mempunyai tunika intima yang terdiri atas endotel dan membran elastika interna, arteriole ditunjukkan dengan bulatan yang agak tebal dipinggirnya.

Tanda panah pada setiap gambar menunjukkan jumlah arteriole endometrium. Pada gambar A, jumlah arteriole masih terlihat normal, gambar A tersebut merupakan kelompok kontrol negatif, dimana pada kelompok tersebut hewan coba tanpa diberi perlakuan. Pada gambar B, terlihat penurunan jumlah arteriole, ini dikarenakan gambar B merupakan kelompok kontrol positif, dimana hewan coba tersebut hanya dipapar asap rokok sebanyak 2 batang/hari. Pada

gambar C, terlihat mulai terjadi peningkatan jumlah arteriole, dimana gambar tersebut merupakan kelompok perlakuan I, pada kelompok tersebut hewan coba dipapar asap rokok 2 batang/hari, selang 2 jam diberikan ekstrak bit merah dengan dosis 125 mg/kgBB/hari. Pada gambar D, jumlah arteriole mulai meningkat dibandingkan dengan gambar C, gambar D merupakan kelompok perlakuan II dimana tikus dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberikan ekstrak bit merah dengan dosis 250 mg/kgBB/hari. Pada gambar E, terlihat peningkatan jumlah arteriole lebih banyak dari kelompok lain, gambar E merupakan kelompok P III dimana hewan coba dipapar asap rokok 2 batang/hari dan diberi ekstrak bit merah dengan dosis 500 mg/kgBB/hari. Peningkatan jumlah arteriole terjadi secara perlahan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak bit merah yang diberikan kepada hewan coba.

5.3 Analisis hasil ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus.

5.3.1 Uji normalitas dan homogenitas data

Pendekatan uji statistik parametrik digunakan bila variabel yang diteliti berskala data interval atau rasio. Dalam penelitian ini variabel ekspresi VEGF dan jumlah arteriole berskala data rasio, sehingga untuk membuktikan hipotesis penelitian digunakan pendekatan analisis statistik parametrik. Sebelum data dianalisis lebih lanjut maka dilakukan analisis statistik non parametrik. Dalam penelitian uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*.

Adapun kriteria keputusan yaitu bila *p-value* lebih besar dari taraf signifikan $\alpha = 0.05$ maka data berdistribusi normal dan sebaliknya bila *p-value* lebih kecil dari taraf signifikan $\alpha = 0.05$ maka data tidak berdistribusi normal. Pada analisis uji *Shapiro-Wilk* diperoleh dan dijelaskan bahwa data ekspresi VEGF dan jumlah arteriole untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai *p-*

value yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi semua data telah terbukti berdistribusi normal sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya data dianalisis dengan uji homogenitas data.

Berdasarkan hasil uji *Levene Statistic* menunjukkan bahwa data ekspresi VEGF ($p=0.433$) dan jumlah arteriole ($p=0.283$) telah menunjukkan nilai *p-value* yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi data kedua variabel telah terbukti homogen sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya data dianalisis dengan uji statistik parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan pada bab sebelumnya.

5.4 Hasil uji perbandingan antar kelompok kontrol positif dan negatif

Untuk membuktikan pengaruh perlakuan paparan asap rokok pada tikus *Rattus norvergicus* terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole, dilakukan analisis komparasi antara kelompok tikus yang tanpa dipapar asap rokok dengan kelompok tikus yang dipapar asap rokok. Pada uji komparasi kelompok kontrol negatif (tikus tanpa perlakuan) dengan kontrol positif (tikus dengan perlakuan paparan asap rokok) pada analisis data ekspresi VEGF dan jumlah arteriole digunakan uji t sampel bebas (*independent sample t test*) ditunjukkan dalam Tabel 5.1 di bawah ini (Lampiran 2).

Tabel 5.1 Hasil perbandingan kelompok kontrol positif dan negatif

| Variabel | Kontrol negatif | Kontrol positif | <i>p-value</i> |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Rerata ± SD | Rerata ± SD | |
| Sel VEGF yang terekspresi | 26.58±1.15 | 16.92±2.84 | 0.000< α |
| Jumlah arteriole | 2.76±0.27 | 1.82±0.26 | 0.000< α |

Keterangan : Jika *p-value* < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika *p-value* > 0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Hasil uji t sampel menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna ($p=0.000<\alpha$) rerata ekspresi VEGF antara kelompok kontrol negatif (tikus tanpa perlakuan) (26.58 ± 1.15) dengan kelompok kontrol positif (tikus dipapar asap rokok) (16.92 ± 2.84). Tabel 5.2 tampak nilai rerata ekspresi VEGF pada kelompok kontrol negatif lebih besar nilainya bila dibandingkan dengan rerata ekspresi VEGF pada kelompok kontrol positif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menunjukkan ekspresi VEGF yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus yang sehat. Dengan kata lain paparan asap rokok pada tikus *Rattus norvegicus* mampu menurunkan ekspresi VEGF.

Demikian pula ada perbedaan yang bermakna dengan nilai $p\text{-value}=0.000$ jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* antara kelompok kontrol negatif (tikus sehat tanpa perlakuan) (2.76 ± 0.27) dengan kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26). Berdasarkan jumlah arteriole tampak pada kelompok kontrol negatif lebih besar jumlahnya bila dibandingkan dengan jumlah arteriole pada kelompok kontrol positif.

Berdasarkan hasil uraian di atas maka dapat dikatakan bahwa paparan asap rokok menyebabkan penurunan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus*. Jadi hipotesis khusus pertama terbukti, yaitu paparan asap rokok dapat menurunkan ekspresi VEGF pada endometrium tikus. Demikian juga hipotesis khusus kedua terbukti, yaitu paparan asap rokok dapat menurunkan jumlah arteriole pada endometrium tikus.

5.5 Hasil uji perbandingan antar kelompok perlakuan

5.5.1 Perbandingan rerata ekspresi VEGF pada kelima kelompok sampel.

Dari hasil uji *Anova one way* pada data ekspresi VEGF diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi VEGF kelima kelompok sampel pengamatan (Lampiran 3). Ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value}=0.000<\alpha$.

Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/LSD (*Least Significant Difference/LSD*) diperoleh secara lengkap pada Tabel 5.2 di bawah ini.

Tabel 5.2 Perbandingan ekspresi VEGF endometrium pada setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

| Kelompok pengamatan | Rerata ± SD | p-value |
|----------------------------------|-------------------------|---------|
| kontrol negatif | 26.58±1.15 ^a | |
| kontrol positif | 16.92±2.84 ^b | |
| PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari) | 21.20±1.60 ^c | 0.000<α |
| PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari) | 22.80±0.91 ^c | |
| PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari) | 25.84±1.39 ^a | |

Keterangan: Pada rerata ± sd menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (*p-value*<0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (*p-value*>0.05).

Berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji *LSD* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi VEGF antara kelompok kontrol negatif (26.58±1.15^a) dengan kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (16.92±2.84^b). Tabel 5.2 tampak nilai rerata ekspresi VEGF kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi VEGF pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menurunkan ekspresi VEGF. Demikian pula kelompok kontrol negatif (26.58±1.15^a) berbeda bermakna dengan kelompok PI (21.20±1.60^c) dan dengan kelompok PII (22.80±0.91^c). Pada kelompok PI dan PII didapatkan hasil yang terlihat ada sedikit peningkatan sel VEGF yang terekspresi, tetapi dalam statistik tidak terlihat perbedaan yang bermakna antara kelompok PI dan PII. Begitu juga sel VEGF yang terekspresi antara kontrol negatif (26.58±1.15^a) dengan kelompok PIII (25.84±1.39^a), hasil yang didapat terdapat peningkatan, tetapi menurut statistik tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok PIII.

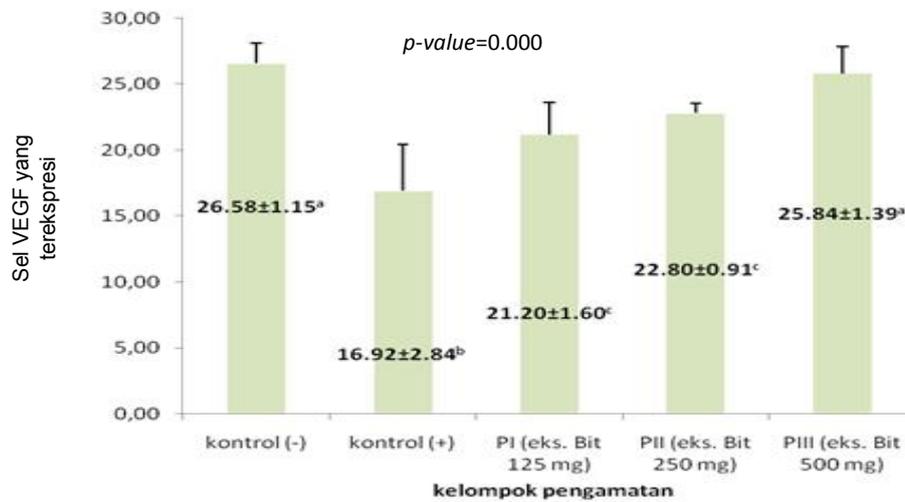
Pada hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi VEGF antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (16.92 ± 2.84^b) dengan kelompok PI atau kelompok perlakuan paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 125 mg/KgBB/hari (21.20 ± 1.60^c). Tampak nilai rerata ekspresi VEGF kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi VEGF pada kelompok PI.

Demikian pula antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (16.92 ± 2.84^b) dengan kelompok PII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 250 mg/KgBB/hari (22.80 ± 0.91^c) menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi VEGF. Nilai rerata ekspresi VEGF kelompok kontrol positif menunjukkan nilai yang lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi VEGF pada kelompok PII.

Hasil di Tabel 5.2 menunjukkan ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi VEGF antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (16.92 ± 2.84^b) dengan kelompok PIII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 500 mg/kgBB/hari (25.84 ± 1.39^a). Nilai rerata ekspresi VEGF kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata ekspresi VEGF pada kelompok PIII.

Perlakuan pemberian ekstrak etanol bit merah dosis 125 mg/kgBB/hari, 250 mg/kgBB/hari, dan 500 mg/kgBB/hari padaa tikus *Rattus norvegicus* yang sebelumnya telah terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan ekspresi VEGF. Jadi hipotesis khusus ketiga terbukti, yaitu pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan ekspresi VEGF pada tikus yang dipapar asap rokok. Rerata ekspresi VEGF pada

kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Gambar 5.4 Histogram ekspresi VEGF pada kelenjar endometrium

5.5.2 Perbandingan jumlah arteriole pada kelima kelompok sampel

Dari hasil uji *Anova one way* pada data jumlah arteriole diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole kelima kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value}=0.000 < \alpha$ (Lampiran 4).

Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Least Significant Difference/LSD*) ditampilkan secara lengkap disajikan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.3 Perbandingan jumlah arteriole endometrium pada setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

| Kelompok pengamatan | Rerata ± SD | p-value |
|----------------------------------|------------------------|---------|
| kontrol negatif | 2.76±0.27 ^a | |
| kontrol positif | 1.82±0.26 ^b | |
| PI (eks. Bit 125 mg/KgBB/hari) | 2.16±0.15 ^b | 0.000<α |
| PII (eks. Bit 250 mg/KgBB/hari) | 2.40±0.07 ^c | |
| PIII (eks. Bit 500 mg/KgBB/hari) | 2.88±0.22 ^a | |

Keterangan: Pada rerata ± sd menunjukkan hasil uji LSD jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0.05$).

Pada Tabel 5.3 dari hasil perbandingan berganda uji *LSD* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok negatif (2.76 ± 0.27^a) dengan kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b). Tampak nilai rerata jumlah arteriole kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata jumlah arteriole pada kelompok kontrol negatif. Hal ini berarti bahwa tikus dengan paparan asap rokok akan menurunkan jumlah arteriole. Demikian pula kelompok kontrol negatif (2.76 ± 0.27^a) berbeda bermakna dengan kelompok PI (2.16 ± 0.15^b) dan dengan kelompok PII (2.40 ± 0.07^c). Pada hasil yang didapatkan terdapat ada perbedaan jumlah arteriole antara kelompok kontrol negatif dan perlakuan III, tetapi menurut statistik tidak berbeda bermakna jumlah arteriole kelompok kontrol negatif (2.76 ± 0.27^a) dengan kelompok PIII (2.88 ± 0.22^a).

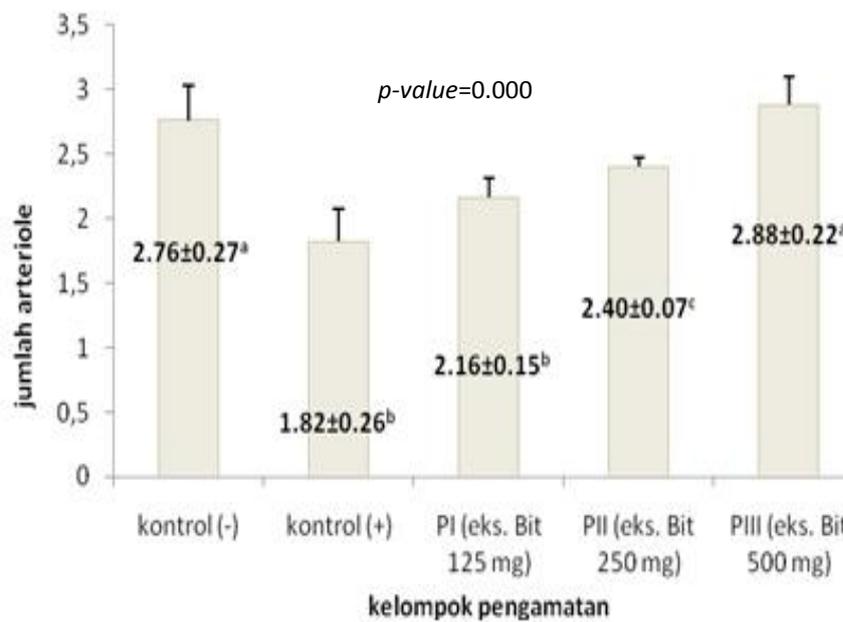
Pada tabel 5.3, hasil jumlah arteriole yang didapatkan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I ada perbedaan jumlah, tetapi menurut statistik tidak ada perbedaan yang bermakna jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PI atau kelompok perlakuan paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 125 mg/kgBB/hari (2.16 ± 0.15^b).

Hasil analisis LSD juga terlihat bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) 250 mg/KgBB/hari (2.40 ± 0.07^c).

Tabel 5.3 menjelaskan adanya perbedaan yang bermakna rerata jumlah arteriole antara kelompok kontrol positif (tikus dengan paparan asap rokok) (1.82 ± 0.26^b) dengan kelompok PIII atau kelompok perlakuan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dosis 500 mg/KgBB/hari (2.88 ± 0.22^a). Tampak nilai rerata jumlah arteriole kelompok kontrol positif lebih kecil bila dibandingkan dengan rerata jumlah arteriole pada kelompok PIII.

Berdasarkan hasil dari Tabel 5.3 diatas maka dapat diartikan bahwa pemberian ekstrak etanol bit merah dosis 125 mg/KgBB/hari, 250 mg/KgBB/hari, dan 500 mg/KgBB/hari untuk tikus *Rattus norvegicus* yang sebelumnya telah terpapar asap rokok berpengaruh bermakna terhadap peningkatan jumlah arteriole. Jadi hipotesis khusus keempat terbukti, yaitu pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dapat meningkatkan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

Selanjutnya rerata jumlah arteriole pada kelima kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram (diagram batang) di bawah ini.



Gambar 5.5 Histogram jumlah arteriole pada endometrium

5.6 Hasil uji korelasi

Uji korelasi adalah suatu uji untuk mengetahui tingkat keeratan hubungan dua variabel. Pada penelitian ini ingin diketahui tingkat keeratan hubungan antara dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*), ekspresi VEGF, dan jumlah arteriole. Pada data dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) tidak menunjukkan bahwa data berdistribusi normal (Lampiran 5), sehingga data dosis dianalisa dengan menggunakan uji korelasi *Spearman's rho*. Adapun kriteria keputusan pada uji korelasi *Spearman's rho*, bila *p-value* < 0.05 maka ada hubungan/korelasi yang bermakna dan bila *p-value* > 0.05 maka ada hubungan/korelasi yang tidak bermakna. Adapun hasil pada uji korelasi *Spearman's rho* ditunjukkan secara ringkas pada tabel di bawah ini (Lampiran 6).

Tabel 5.4 Hasil uji korelasi

| Variabel yang dihubungkan | Koefisien Korelasi (r) | Arti | p-value |
|---------------------------------------|------------------------|----------------------|---------|
| Dosis dengan ekspresi VEGF | 0.880 | Korelasi kuat | 0.000 |
| Dosis dengan jumlah arteriole | 0.907 | Korelasi sangat kuat | 0.000 |
| Ekspresi VEGF dengan jumlah arteriole | 0.801 | Korelasi kuat | 0.000 |

Keterangan: Pada kolom *p-value* jika *p-value* < 0.05 berarti ada korelasi yang bermakna dan jika *p-value* > 0.05 berarti ada korelasi yang tidak bermakna.

Hasil dari tabel 5.4 terlihat bahwa ada hubungan/korelasi yang bermakna ($r = 0.880$) antara dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ($n=15$). Nilai positif pada koefisien korelasi 0.880 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila pemberian dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ditingkatkan maka akan berakibat terjadi peningkatan pula terhadap ekspresi VEGF pada tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebelumnya. Demikian pula sebaliknya, bila dosis yang diberikan rendah maka ekspresi VEGF akan rendah pula.

Tabel 5.4 menyatakan bahwa ada hubungan/korelasi yang bermakna antara dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan jumlah arteriole ($p\text{-value}=0.000 < \alpha$) pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ($n=15$) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang sangat kuat yaitu $r = 0.907$. Nilai positif pada koefisien korelasi 0.907 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila pemberian dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ditingkatkan maka akan berakibat terjadi peningkatan jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebelumnya. Demikian pula sebaliknya, bila dosis yang diberikan rendah maka jumlah arteriole akan rendah pula.

Berdasarkan uraian hasil di atas maka hipotesis khusus kelima terbukti, yaitu ada hubungan antara dosis dan efek bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan peningkatan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.

Pada tabel 5.4 terlihat adanya hubungan/korelasi yang bermakna antara ekspresi VEGF dengan jumlah arteriole pada kelompok perlakuan pemberian paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) (n=15) dengan ditunjukkan tingkat keeratan hubungan atau nilai koefisien korelasi yang kuat yaitu $r = 0.801$. Nilai positif pada koefisien korelasi 0.801 menjelaskan adanya hubungan yang seiring, yaitu bila terjadi penurunan ekspresi VEGF maka akan berakibat terjadi pula penurunan jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* sebagai dampak dari perlakuan paparan asap rokok. Demikian pula sebaliknya, bila ekspresi VEGF naik maka jumlah arteriole akan meningkat pula pada tikus *Rattus norvegicus* sebagai efek dari diberinya ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) dan dipapar asap rokok. Jadi hipotesis khusus kelima terbukti, yaitu ada hubungan antara dosis dan efek bit merah (*Beta vulgaris L.*) dengan peningkatan VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

BAB 6**PEMBAHASAN****6.1 Karakteristik klinis penelitian**

Pada saat diberikan perlakuan, tikus sudah dipisahkan kedalam masing-masing kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Tikus baru diberi perlakuan apabila tikus tersebut sudah dicek fase proestrus melalui swab vagina. Pada awal diberikan perlakuan, keaktifan tikus terlihat agak menurun, ini diakibatkan karena paparan asap rokok. Makanan dan minuman yang diberikan juga banyak yang tersisa. Tetapi beberapa hari kemudian makanan dan minuman yang diberikan tidak ada yang tersisa, hanya saja keaktifan tikus sedikit menurun setelah dipapar asap rokok.

Pada bab sebelumnya telah dijelaskan secara teori efek apa saja yang dapat ditimbulkan akibat terpapar dengan asap rokok, baik efek diparu-paru atau organ reproduksi. Pada penelitian ini efek yang dilihat lebih mengarah ke organ reproduksi yaitu endometrium, dimana dapat dilihat dari hasil penelitian ini bahwa terpaparnya hewan coba dengan asap rokok sebanyak 2 batang per hari selama 56 hari dapat menyebabkan penurunan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada hewan coba. Ini dikarenakan akibat peningkatan ROS didalam tubuh yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan antioksidan dalam tubuh menjadi menurun.

Penelitian ini menggunakan ekstrak bit merah dikarenakan senyawa yang terkandung didalamnya yaitu berupa betalain mengandung banyak antioksidan yang dibutuhkan oleh tubuh untuk menangkal radikal bebas yang menyebabkan terjadinya gangguan pada organ reproduksi.

6.2 Perbandingan kelompok kontrol negatif dan positif

Perbandingan antar kelompok kontrol positif dan negatif menjelaskan bahwa tikus yang terpapar asap rokok akan menunjukkan jumlah arteriole yang lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus yang sehat. Dengan kata lain paparan asap rokok pada tikus *Rattus norvegicus* mampu menurunkan jumlah arteriole.

6.3 Ekstrak etanol bit merah terhadap ekspresi VEGF endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok

Tikus dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ekspresi VEGF bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan ekspresi VEGF.

Paparan asap rokok dan pemberian ekstrak etanol bit merah 250 mg/KgBB/hari akan meningkatkan ekspresi VEGF bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 250 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan ekspresi VEGF.

Tikus yang di papar asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 500 mg/kgBB/hari akan meningkatkan ekspresi VEGF bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 500 mg/kgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan ekspresi VEGF.

Hal ini berarti bahwa paparan asap rokok pada tikus mengakibatkan ekspresi VEGF menurun. Sedangkan rerata ekspresi VEGF tampak meningkat pada kelompok PI, PII, dan PIII bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Peningkatan ekspresi VEGF seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang diberikan. Jadi pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan ekspresi VEGF pada tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebelumnya. Sedangkan dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang dianggap paling cepat mampu meningkatkan ekspresi VEGF adalah dosis 500 mg/KgBB/hari.

Pernah dilakukan penelitian sebelumnya bahwa terbukti terjadi penurunan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok. Hal ini hampir menyerupai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti, tetapi terdapat perbedaan dimana penelitian sebelumnya menggunakan *Alfatokoferol* untuk memperbaiki kerusakan organ akibat paparan asap rokok dan penelitian yang dilakukan peneliti saat ini menggunakan ekstrak etanol bit merah untuk meningkatkan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.

Sarokhani *et al* (2017) mengatakan bahwa satu batang rokok mengandung berbagai macam senyawa kimia, beberapa diantaranya beracun dan karsinogenik. Zat-zat beracun tersebut memberikan dampak yang besar terhadap sistem reproduksi manusia seperti ketidaksuburan pada pria dan wanita. Jika merokok dalam jangka waktu yang lama, ketidaksuburan akan terus meningkat. Bravi *et al* (2014) menjelaskan bahwa perokok memiliki resiko lebih besar terhadap kejadian endometriosis dibandingkan dengan bukan perokok. Perlu diketahui bahwa endometriosis merupakan suatu kondisi ginekologi kronis akibat gangguan hormon estrogen yang ditandai dengan proliferasi jaringan endometrium yang menyebabkan rasa sakit dan ketidaksuburan.

Mengacu pada teori yang dijelaskan diatas bahwa apabila terjadi gangguan pada endometrium atau ovarium, maka kemungkinan untuk terjadi

ketidaksuburan pada wanita akan lebih besar. Oleh karena pencegahan yang bisa dilakukan yaitu mengurangi keterpaparan dengan asap rokok.

Conklin *et al* (2002) menyebutkan bahwa merokok merupakan salah faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya penurunan ekspresi VEGF. VEGF mempunyai peran terhadap peningkatan kadar plasma darah. Apabila ekspresi VEGF terganggu maka akan terjadi gangguan produksi kadar plasma dalam darah. Nikotin yang terdapat dalam asap rokok juga dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sel endotel, kematian sel endotel dan peningkatan transportasi makromolekul plasma.

Oleh karena itu perlu dilakukan pencegahan secara dini untuk mencegah terjadinya penurunan ekspresi VEGF pada endometrium, salah satunya menyeimbangkan antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh. Salah satu sumber makanan yang mengandung antioksidan yaitu bit merah (*Beta vulgaris L.*). Bit merah mengandung senyawa betalain yang terdapat banyak antioksidan, bit merah juga bersifat sebagai anti-inflamasi yang dapat menghambat stres oksidatif pada organ reproduksi seperti endometrium. Dengan mengkonsumsi bit merah dengan dosis yang benar dapat meningkatkan daya tahan tubuh sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan pada organ reproduksi wanita.

6.4 Ekstrak etanol bit merah terhadap jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok

Tikus dengan paparan asap rokok yang diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/kgBB/hari dapat meningkatkan jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 125 mg/kgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Tikus yang terpapar dengan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah dosis 250 mg/KgBB/hari akan lebih banyak jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 250 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Tikus yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol Bit merah 500 mg/KgBB/hari akan meningkatkan jumlah arteriole bila dibandingkan dengan tikus yang terpapar asap rokok saja. Dengan kata lain paparan asap rokok dan diberi ekstrak etanol bit merah 500 mg/KgBB/hari pada tikus *Rattus norvegicus* dapat meningkatkan jumlah arteriole.

Hal ini berarti bahwa paparan asap rokok pada tikus mengakibatkan jumlah arteriolenya meningkat. Sedangkan rerata jumlah arteriole tampak meningkat pada kelompok PI, PII, dan PIII bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Peningkatan jumlah arteriole seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang diberikan. Jadi pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) ketiga dosis tersebut mampu meningkatkan jumlah arteriole pada tikus *Rattus norvegicus* yang dipapar asap rokok sebelumnya.

Sedangkan dosis ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris L.*) yang dianggap paling cepat mampu meningkatkan jumlah arteriole adalah dosis 500 mg/KgBB/hari.

Studi ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Kazi (2007) dan menjelaskan apabila terjadi gangguan pembentukan pembuluh darah yang baru (angiogenesis) dapat menyebabkan kelainan berupa perdarahan pada saat menstruasi, kegagalan nidasi hasil konsepsi dan amenorea. Ini dikarenakan akibat dari penurunan ekspresi VEGF yang menghambat proses proliferasi pada endometrium.

Hampir sama dengan penelitian yang pernah dilakukan di Eropa dan Amerika Serikat, dimana akibat merokok lebih dari 10 batang perhari dapat

menyebabkan penundaan hasil konsepsi dan kejadian prematur (Soares dan Melo, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh peneliti yaitu menggunakan hewan coba yang dipapar asap rokok selama 56 hari dengan paparan asap rokok 2 batang per hari. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah arteriole pada kelompok kontrol positif yang hanya dipapar dengan asap rokok saja, dan mulai terjadi peningkatan jumlah arteriole pada kelompok yang diberi ekstrak bit merah dengan berbagai dosis. Hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Kawashima *et al* (2004) mengatakan bahwa paparan asap rokok dapat menyebabkan gangguan pada plasenta selama kehamilan awal, ini dikaitkan dengan hipoksia vili yang dapat mempengaruhi angiogenesis dan apoptosis.

Angiogenesis mempunyai peran penting pada siklus endometrium, ini dipengaruhi oleh hormon ovarium. Pada saat terjadinya menstruasi, angiogenesis berperan untuk mempertahankan jaringan endometrium dan pertumbuhan pembuluh darah yang luruh setelah fase menstruasi. Pada fase proliferasi endometrium dibutuhkan proses angiogenesis, dimana hal tersebut berguna untuk implantasi dan perkembangan embrio (Frisca *et al.*, 2009).

Terjadinya gangguan angiogenesis pada endometrium salah satunya diakibatkan karena gaya hidup yang tidak sehat misalnya seseorang yang menjadi perokok pasif. Asap rokok diketahui dapat mempengaruhi sekresi estrogen dalam tubuh, walaupun beberapa peneliti mengatakan efek asap rokok dapat menurunkan kejadian kanker yang diduga karena asap rokok dapat mengurangi estrogen (Karnasih *et al.*, 2015).

Untuk mencegah terjadinya penurunan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium, keseimbangan antioksidan sangat dibutuhkan guna untuk menyeimbangkan radikal bebas yang ada dalam tubuh akibat paparan asap rokok. Salah satu bahan alami yang mengandung banyak antioksidan adalah bit merah.

Bit mengandung pigmen bioaktif dan dikenal sebagai betalain. Penelitian lainnya mengemukakan bahwa betalain mempunyai antioksidan yang sangat tinggi dan berfungsi juga sebagai antiinflamasi yang tinggi. Bit merah dapat mempertahankan antioksidan endogen yang membantu melindungi kerusakan oksidatif (Clifford *et al.*, 2015).

6.5 Keterbatasan penelitian

Terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini yang menyebabkan penelitian ini kurang sempurna, sehingga diharapkan untuk peneliti selanjutnya dapat menyempurnakan dengan lebih baik. Beberapa keterbatasan tersebut berupa dosis maksimal ekstrak bit merah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 500 mg/kgBB/hari. Ini menunjukkan hasil yang baik karena terbukti dapat meningkatkan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus. Peneliti berharap untuk kedepan ada lanjutan penelitian tentang ekstrak bit merah dengan peningkatan dosis diatas 500 mg/kgBB/hari. Tujuannya untuk melihat sampai batas maksimum berapakah efektif digunakan bit merah untuk memperbaiki kerusakan pada endometrium.

Peneliti juga mempunyai keterbatasan pada melakukan pemeriksaan proestrus, dikarenakan peneliti masih kurang memahami bacaan proestrus dibawah mikroskop. Disini peneliti meminta bantuan kepada mahasiswi S1 Kebidanan FKUB untuk membantu peneliti pada saat membaca fase proestrus pada tikus.

Keterbatasan lainnya yaitu pada saat menghitung ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus, peneliti harus menghitung secara manual. Ini ditakutkan akan berdampak pada bacaan hasil, dikarenakan peneliti masih terbatas dalam kemampuan menghitung sel yang terekspresi. Diharapkan untuk kedepannya, ada laboran khusus yang dapat membantu peneliti dalam

menghitung sel tersebut. Ini supaya hasil bacaan yang akan didapatkan mendapatkan hasil yang maksimal.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

a. Kesimpulan Umum

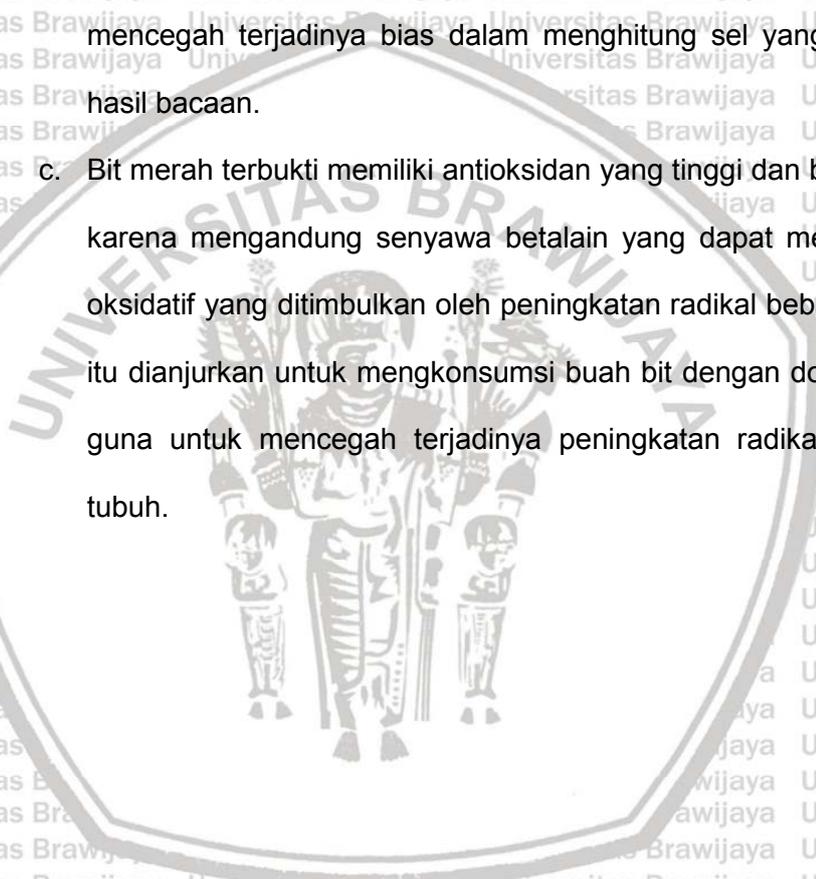
Ada pengaruh pemberian ekstrak etanol bit merah (*Beta vulgaris* L.) terhadap ekspresi VEGF dan jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok.

b. Kesimpulan Khusus

- 1) Tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari selama 56 hari atau 2 bulan terbukti dapat menurunkan ekspresi VEGF pada endometrium tikus.
- 2) Tikus yang dipapar asap rokok 2 batang/hari selama 56 hari atau 2 bulan terbukti dapat menurunkan jumlah arteriole pada endometrium tikus.
- 3) Pemberian ekstrak etanol bit merah terbukti dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan ekspresi VEGF pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.
- 4) Pemberian ekstrak etanol bit merah terbukti dapat mencegah ketidaksuburan melalui peningkatan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.
- 5) Ada hubungan antara dosis dan efek bit merah dengan peningkatan ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus yang dipapar asap rokok.

7.2 Saran

- a. Peneliti berharap kedepan ada lanjutan penelitian ini dengan meningkatkan dosis bit merah yang bertujuan untuk melihat apakah dengan dosis lebih tinggi bit merah bisa bersifat toksik untuk organ reproduksi.
- b. Peneliti juga berharap kedepan ada aplikasi khusus untuk menghitung jumlah sel yang tereksresi pada suatu jaringan. Ini dikarenakan untuk mencegah terjadinya bias dalam menghitung sel yang berefek pada hasil bacaan.
- c. Bit merah terbukti memiliki antioksidan yang tinggi dan baik dikonsumsi karena mengandung senyawa betalain yang dapat mengurangi stres oksidatif yang ditimbulkan oleh peningkatan radikal bebas, oleh karena itu dianjurkan untuk mengkonsumsi buah bit dengan dosis yang benar guna untuk mencegah terjadinya peningkatan radikal bebas dalam tubuh.



DAFTAR ISI

| | |
|---|----------|
| LEMBAR PERSETUJUAN | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN | iii |
| PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS | iv |
| HALAMAN PERUNTUKAN | v |
| RINGKASAN | vi |
| SUMMARY | vii |
| KATA PENGANTAR | viii |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| DAFTAR SINGKATAN | xvii |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah Umum | 4 |
| 1.2.1 Rumusan Masalah Khusus | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.3.1 Tujuan Umum | 5 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus | 5 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 6 |
| 1.4.1 Manfaat Teoritis | 6 |
| 1.4.2 Manfaat Klinis | 6 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| 2.1 Paparan asap rokok | 7 |
| 2.2 Kandungan kimia dalam rokok | 8 |
| 2.2.1 Fase Rokok | 9 |
| 2.3 Infertilitas | 10 |
| 2.3.1 Pengertian | 10 |
| 2.3.2 Patofisiologi Infertilitas | 10 |
| 2.4 Radikal Bebas, ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>) dan Stres Oksidatif | 11 |
| 2.4.1 Radikal Bebas | 11 |
| 2.4.2 Definisi ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>) | 12 |
| 2.4.3 Definisi Stres Oksidatif | 13 |
| 2.4.4 Efek ROS terhadap Sel | 13 |
| 2.4.5 Asap rokok dan Radikal Bebas | 15 |



| | | |
|--------------|--|-----------|
| 2.4.6 | Pengaruh Asap Rokok Terhadap Organ Reproduksi Wanita | 15 |
| 2.5 | Endometrium..... | 17 |
| 2.5.1 | Histologi Endometrium..... | 17 |
| 2.5.2 | Siklus Endometrium..... | 17 |
| 2.6 | <i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i> | 19 |
| 2.6.1 | Kelompok VEGF..... | 19 |
| 2.6.2 | Reseptor VEGF..... | 20 |
| 2.7 | Angiogenesis..... | 21 |
| 2.7.1 | Definisi..... | 21 |
| 2.7.2 | Proses terjadinya Angiogenesis..... | 22 |
| 2.8 | Estrogen..... | 24 |
| 2.8.1 | Pengertian Estrogen..... | 24 |
| 2.8.2 | Pengaruh Estrogen dalam Angiogenesis..... | 24 |
| 2.8.3 | Angiogenesis pada Endometrium..... | 25 |
| 2.9 | Pengaruh Asap Rokok terhadap VEGF dan Angiogenesis Endometrium..... | 26 |
| 2.10 | Antioksidan..... | 27 |
| 2.10.1 | Definisi..... | 27 |
| 2.10.2 | Jenis Antioksidan..... | 28 |
| 2.11 | Buah Bit Merah (<i>Beta vulgaris L.</i>)..... | 29 |
| 2.11.1 | Klasifikasi bit merah (<i>Beta vulgaris L.</i>)..... | 31 |
| 2.11.2 | Kandungan bit merah (<i>Beta vulgaris L.</i>)..... | 32 |
| 2.12 | Reproduksi Tikus..... | 33 |
| 2.13 | Kerangka Teori..... | 36 |
| BAB 3 | KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN..... | 38 |
| 3.1 | Kerangka Konsep..... | 38 |
| 3.2 | Hipotesis Penelitian..... | 40 |
| BAB 4 | METODOLOGI PENELITIAN..... | 41 |
| 4.1 | Jenis dan Desain Penelitian..... | 41 |
| 4.2 | Tempat dan Waktu Penelitian..... | 41 |
| 4.3 | Sampel Penelitian..... | 41 |
| 4.4 | Bahan dan Alat..... | 43 |
| 4.4.1 | Bahan..... | 43 |
| 4.4.2 | Alat..... | 44 |
| 4.5 | Proses Ekstraksi Bit Merah (<i>Beta vulgaris L.</i>)..... | 45 |
| 4.5.1 | Pembuatan ekstrak bit dengan menggunakan etanol..... | 45 |
| 4.5.2 | Kebutuhan ekstrak bit merah..... | 46 |
| 4.5.3 | Pemberian ekstrak bit merah..... | 47 |
| 4.6 | Variabel Penelitian..... | 48 |
| 4.7 | Definisi Operasional..... | 48 |
| 4.8 | Prosedur Penelitian..... | 49 |
| 4.8.1 | Aklimatisasi Tikus..... | 49 |
| 4.8.2 | Prosedur apusan vagina dan pemeriksaan fase proestrus pada hewan coba..... | 50 |
| 4.8.3 | Pembagian Kelompok..... | 50 |
| 4.8.4 | Prosedur Isolasi Sampel Jaringan Organ Endometrium..... | 51 |
| 4.8.5 | Pembuatan Preparat Histopatologi Endometrium..... | 52 |
| 4.9 | Teknik Analisis Data..... | 54 |
| 4.9.1 | Uji prasyarat parametrik..... | 55 |

| | |
|--|------------|
| 4.9.2 Uji <i>anova One Way</i> | 55 |
| 4.9.3 Uji Korelasi | 56 |
| 4.10 Alur Penelitian..... | 57 |
| BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA..... | 58 |
| 5.1 Hasil Pengamatan Hewan Coba | 58 |
| 5.2 Hasil Pengamatan ekspresi VEGF dan Jumlah arteriole pada endometrium tikus..... | 59 |
| 5.3 Analisis hasil ekspresi VEGF dan jumlah arteriole pada endometrium tikus..... | 64 |
| 5.3.1 Uji normalitas dan homogenitas data..... | 64 |
| 5.4 Hasil uji perbandingan antar kelompok kontrol positif dan negatif..... | 65 |
| 5.5 Hasil uji perbandingan antar kelompok perlakuan..... | 66 |
| 5.5.1 Perbandingan rerata ekspresi VEGF pada kelima kelompok sampel | 66 |
| 5.5.2 Perbandingan rerata jumlah arteriole pada kelima kelompok sampel | 69 |
| 5.6 Hasil uji korelasi | 72 |
| BAB 6 PEMBAHASAN..... | 75 |
| 6.1 Karakteristik klinis penelitian | 75 |
| 6.2 Perbandingan kelompok kontrol negatif dan positif | 76 |
| 6.3 Ekstrak etanol bit merah terhadap ekspresi VEGF endometrium pada tikus yang dipapar asap rokok | 76 |
| 6.4 Ekstrak etanol bit merah terhadap jumlah arteriole endometrium pada tikus yang dipapar asap | 78 |
| 6.5 Keterbatasan penelitian..... | 81 |
| BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN..... | 83 |
| 7.1 Kesimpulan | 83 |
| 7.2 Saran | 84 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 85 |
| LAMPIRAN..... | 90 |
| RIWAYAT HIDUP..... | 112 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabel 4.1 | Definisi Operasional | 49 |
| Tabel 5.1 | Hasil perbandingan kelompok kontrol positif dan negatif | 65 |
| Tabel 5.2 | Perbandingan ekspresi VEGF endometrium pada setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 67 |
| Tabel 5.3 | Perbandingan jumlah arteriole endometrium pada setiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan | 70 |
| Tabel 5.4 | Hasil uji korelasi | 73 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|--|----|
| Gambar 2.1 | Bahan yang terkandung dalam rokok..... | 9 |
| Gambar 2.2 | Struktur elektrok dari spesies oksigen reaktif umum..... | 12 |
| Gambar 2.3 | Kelompok VEGF dari faktor pertumbuhan..... | 20 |
| Gambar 2.4 | Umbi bit merah..... | 29 |
| Gambar 2.5 | Senyawa berpotensi bioaktif dalam bit..... | 31 |
| Gambar 2.6 | Gambar alat reproduksi tikus betina..... | 34 |
| Gambar 2.7 | Kerangka Teori..... | 36 |
| Gambar 3.1 | Kerangka Konsep..... | 38 |
| Gambar 4.1 | Skema Alur Penelitian..... | 57 |
| Gambar 5.1 | Fase Proestrus pada tikus betina yang diamati dibawah mikroskop..... | 58 |
| Gambar 5.2 | Jumlah sel kelenjar endometrium yang mengekspresi VEGF pada endometrium tikus..... | 60 |
| Gambar 5.3 | Arteriole pada sel kelenjar endometrium tikus..... | 63 |
| Gambar 5.4 | Histogram rerata ekspresi VEGF..... | 69 |
| Gambar 5.5 | Histogram rerata jumlah arteriole..... | 72 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------|--|-----|
| Lampiran 1 | Surat Keterangan Kelaikan Etik | 90 |
| Lampiran 2 | Surat Keterangan Bebas Plagiasi | 91 |
| Lampiran 3 | Bukti <i>Accepted</i> Jurnal | 92 |
| Lampiran 4 | Dokumentasi Penelitian | 93 |
| Lampiran 5 | Hasil Uji Normalitas Data | 99 |
| Lampiran 6 | Hasil Uji Perbandingan Kelompok Kontrol | 100 |
| Lampiran 7 | Hasil Uji Perbandingan Kelompok Perlakuan Pada Data Ekspresi VEGF | 101 |
| Lampiran 8 | Hasil Uji Perbandingan Kelompok Perlakuan Pada Data Jumlah Arteriole | 103 |
| Lampiran 9 | Hasil Uji Normalitas Data Dosis Ekstrak Bit Merah | 105 |
| Lampiran 10 | Hasil Uji Korelasi | 106 |
| Lampiran 11 | Permohonan Melakukan Penelitian | 107 |
| Lampiran 12 | Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Farmakologi | 108 |
| Lampiran 13 | Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Sental Biomedik | 109 |
| Lampiran 14 | Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi | 110 |
| Lampiran 15 | Surat Keterangan Pembacaan Histologi dan Immunohistokimia Endometrium | 111 |

DAFTAR SINGKATAN

- BHA : *Butylated Hydroxyl Anisole*
- BHT : *Butylated Hydroxyrotoluene*
- BM : *Basemenst Membrane*
- BNT : *Beda Nyata Terkecil*
- CNS : *Central Nervous System*
- CO : *Carbon Monoxide*
- CS : *Cigarette Smoke*
- CSE : *Cigarette Smoke Extract*
- DAB : *Diaminobenzidine*
- DNA : *Deoxyribose Nucleic Acid*
- E1 : *Estron*
- EC : *Endothelial Cell*
- ECM : *Extracellular Matrix*
- EDTA : *Etile Diamin Tetraasetat Acid*
- FSH : *Follicle Stimulating Hormone*
- GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*
- GSH : *Group Screen Hold*
- HBes : *Human Bronchial Epithelial Cells*
- HE : *Haematoksilin Eosin*
- IHC : *Immunohistochemistry*
- IVF : *In Vitro Fertilization*
- KL : *Korpus Luteum*
- KP : *Kelompok Perlakuan*
- LH : *Luteinizing Hormone*
- LSD : *Least Significan Difference*



- LVC : *Low Viscosity Cement*
- MMPs : *Matrik Metaloproteinase*
- NaCL : *Natrium Chlorida*
- NADPH : *Adenin Dinukleotida Fosfat*
- NDGA : *Nordihydro Guaretic Acid*
- NO : *Nitric Oxide*
- NRF : *Rokok Non Filter*
- NRP : *Neuropilin*
- OS : *Oxidative Stress*
- Pb : *Timah hitam atau Plumbum*
- PCOS : *Polycystic Ovary Syndrome*
- PG : *Propyl Gallate*
- pH : *Potensial Hidrogen*
- PIGF : *Particularly Placental Growth Factor*
- RAL : *Rancangan Acak Lengkap*
- RF : *Rokok Filter*
- ROS : *Reactive Oxygen Species*
- SKM : *Sigaret Kretek Mesin*
- SKT : *Sigaret Kretek Tangan*
- SOD : *Spesies Oxygen Dismutase*
- TBHQ : *Tertiary Butyl Hydroquinone*
- VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*



DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Mellado, A.A., Premkumar, J.B., Shaman, A., Gupta, S. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review', *Reprod Biology and Endocrinology*, 10(49), pp. 1–31.
- Akbar, B. 2010. Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas. Jakarta : Adabia Press.
- Aritonang J. 2014. Pengaruh Pemberian Alftokoferol Terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Jumlah Arteriole Spiralis Pada Endometrium Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang Dipapar Asap Rokok. Tesis Pascasarjana Universitas Brawijaya.
- Bravi, F., Parazzini, F., Cipriani, S., Chiaffarino, F., Ricci, E., Chiantera, V., Vecchia, L.C. 2014. Tobacco smoking and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis doi:10.1136/bmjopen-2014-006325.
- Benjamin, M.R. 2012. Surgeon General ' s Perspectives', 127(February), pp. 1–2.
- Bigarella, L.C., Liang, R., Ghaffari, S. 2014. Stem cells and the impact of ROS signaling', *Development*, 141(22), pp. 4206–4218. doi: 10.1242/dev.107086.
- Birben, E., Sahiner, M.U., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2010. Oxidative Stress and Antioxidant Defense', *WAO Journal*, 5 (January), pp. 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Broeman, F.J and Fauser B.C.J.M. 2016. Female Infertility : Evaluation and Management. Chapter 132.
- Burton, J.G., Jauniaux, E. 2011. Oxidative stress', *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. Elsevier Ltd, 25(3), pp. 287–299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016.
- Caligioni, C. 2010. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice 'NIH Public Access', *Curr Protoc Neurosci*, pp. 1–11. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48.Assessing.
- Clifford, T., Howatson, G., West, J.D., Stevenson, J.E. 2015. 'The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease', *Nutrients*, 7(4), pp. 2801–2822. doi: 10.3390/nu7042801.
- Cunningham, G.F., Leveno, J.K., Bloom, L.S., Hauth, C.J., Rouse, J.D., Spong, Y.C. 2016. *Obstetri Williams*, Ed. 23. Volume 1. EGC. Jakarta.
- Coklin, S.B., Zhao, W., Zhong, S.D., Chen, C. 2002. Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cels. *American Journal of Pathology*, Vol. 160, No. 2, February 2002.

Dechanet, C., Anahory, T., Daude M.C.J., Quantin. X., Reyftmann. L., Hamamah., et al. 2010. Effects of cigarette smoking on reproduction', *Human Reproduction Update*, Vol.17, No.1 pp. 76–95, 2011 *Advanced Access publication on August 4, 2010 doi:10.1093/humupd/dmq033*.

Deka, K.P., Sarma, S. 2010. Psychological aspects of infertility. *British Journal of Medical Practitioners*, September 2010, Volume 3, Number 3.

Fusco, D., Colloca, G., Monaco, L.R.M., Cesari, M. 2007. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging* 2007;2(3) 377–387.

Frisca, C.T., Sarjhono dan Sandra, F. 2009. Angiogenesis : patofisiologi dan aplikasi klinis. *JKM*. 8 (2) : 174-187

Gargett, E.C., and Rogers, W.A.P. 2001. Human endometrial angiogenesis', *Reproduction*, 121(2), pp. 181–186. doi: 10.1530/reprod/121.2.181.

Guyton, A.C. 2010. *Buku Teks Fisiologi Kedokteran*. Penerjemah: Darma, A., dan Lukmanto, P. Jakarta : EGC.

Haris, W.O., 2014, *Penuntun Praktikum Fisiologi Reproduksi Hewan*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Halu Oleo, Kendari.

Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, A.L., Ameen, M.O., Lawal, A. 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications', *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), pp. 142–151. doi: 10.1590/S0103-90162006000300002.

Haris, A., Ikhsan, M., Rogayah, R. 2012. *Asap Rokok Sebagai Bahan Pencemar Dalam Ruangan*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. CDK-189., 39 (1).

Hastings, J.M., Licence, D.R., Burton, G.J., Jones, C.D.S., Smith, S.K. 2003. Soluble vascular endothelia growth factor receptor 1 inhibits edema and epithelia proliferation induced by 17bete-estradiol in the mouse uterus. *Endocrinology*. 144: 326-334.

Held, P. 2012. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells', *BioTek Instruments*, pp. 1–14. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Hellermann, R.G., Nagy, B.S., Kong, X., Lockey, F.R., Mohapatra, S.S. 2002. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells', *Respiratory Research*, 3(1), p. 22. doi: 10.1186/rr172.

Jaya, M. 2009. *Pembunuh Berbahaya Itu Bernama Rokok*. Yogyakarta. Rizma.

Joseph, V. et al. 2016. 'Efek akut merokok kretek terhadap fungsi ventrikel kanan', *Jurnal Biomedik (JBM)*, 8 (Juli, 2016), pp. 23-29.

Jeyabalan, A., Powers, W.R., Durica, R.A., Harger, F.G., Roberts, M.J., Ness, B.R. 2008. Cigarette Smoke Exposure and Angiogenic Factors in Pregnancy and Preeclampsia. *American journal of hypertension*. Volume 21 number 8. 943-947.

Kardi. 2015. Pemberian Glutathion Pada Mencit Jantan Dewasa Yang Terpapar Asap Rokok Dapat Meningkatkan Motilitas Progresif Spermatozoa. Program Magister Ilmu Biomedik Universitas Udayana Denpasar.

Karizbodagh, P.M., Rashidi, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A., Mirzaei, H. 2017. Implantation Window and Angiogenesis', *Journal of Cellular Biochemistry*, (March 2017). doi: 10.1002/jcb.26088.

Kazi, A.A., Koos, D.R. 2007. Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway', *Endocrinology*, 148(5), pp. 2363–2374. doi: 10.1210/en.2006-1394.

Kawashima, A., Koide, K., Ventura, W., Hori, K., Takenaka, S., Maruyama, D., Matsuoka, R., Ichizuka, K., Sekizawa, A. 2014. Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. <http://scihub.tw/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106140>

Lange, C., Storkebaum, E., Almodovar, R.C., Dewerchin, M., Carmeliet, P. 2016. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 439–454. doi: 10.1038/nrneurol.2016.88.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, N., Chandra. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health', *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), p. 118. doi: 10.4103/0973-7847.70902.

Losordo, W.D., and Isner, M.J. 2001. Brief Reviews. 'Estrogen and Angiogenesis. A Review' pp. 6–13. doi: 10.4049/jimmunol.1302972.

Maraldi, T., Angeloni, C., Gionnoni, E., Sell, C. 2015. Reactive oxygen species in stem cells', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, pp. 2–4. doi: 10.1155/2015/159080.

Michaud, E.S., Menard, C., Guy, G.L., Gennaro, G., Rivard, A. 2003. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 α /VEGF pathway. The FASEB Journal express article 10.1096/fj.02-0172je. Published online April 22, 2003.

Moris, B.P., Ference, A.B., Jahangir, E., Feldman, N.D., Ryan, J.J., Bahrami, H., et al. 2015. Cardiovascular Effects of Exposure to Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes: Clinical Perspectives from the Prevention of Cardiovascular Disease Section Leadership Council and Early Career Councils of the American College of Cardiology', *Journal of the American College of Cardiology*, 66(12), pp. 1378–1391. doi: 10.1016/j.jacc.2015.07.037.

Mittler, R. 2017. ROS Are Good', *Trends in Plant Science*, 22(1), pp. 11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.

Mroczek, A., Kapusta, I., Janda, B., Janiszowska, W. 2012. 'Triterpene saponin content in the roots of red beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), pp. 12397–12402. doi: 10.1021/jf303952x.

Nani, G., Nurliani, A., Budi, H., Mintowati, E. 2015. Efek Pemberian Fraksi Diklorometana Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine Americana*) Pada Kualitas Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Yang Dipapar Asap Rokok. *Bioscientiae* Volume 12, Nomor 1, Januari 2015, Halaman 43 – 59.

Nayak, N.R., Brenner., R. 2002. Vascular Proliferation and Vascular endothelia growth factor expression in the rhesus macaque endometrium. *J.Clin. Endocrinal Metab.* 87: 1845-1855.

Nurrahmah. 2014. Pengaruh rokok terhadap kesehatan dan pembentukan karakter manusia. *Prosiding Seminar Nasional* Volume 01, Nomor 1.

Ridhoila, I., Yusrawati., Amir, A. 2017. Perbandingan Kualitas Spermatozoa Pada Analisis Semen Pria Dari Pasangan Infertil Dengan Riwayat Merokok Dan Tidak Merokok. *Artikel Penelitian. Jurnal Kesehatan Andalas.* 2017; 6(2). <http://jurnal.fk.unand.ac.id>.

Sarokhani, M., Veisani, Y., Mohamadi, A., Delpisheh, A., Sayehmiri, K., Moghadam, D.A., Aryanpur, M. 2017. Association between cigarette smoking behavior and infertility in women : a case-control study. *Biomedical Research and Therapy.* Vol 4, No 10.

Schlieve, R.C., Mojico, G.S., Holyoda, A.K., Hou, X., Fowler, L.K., Grikscheit, C.T. 2016. Vascular endothelial growth factor (VEGF) bioavailability regulates angiogenesis and intestinal stem and progenitor cell proliferation during postnatal small intestinal development', *PLoS ONE*, 11(3), pp. 1–28. doi: 10.1371/journal.pone.0151396.

Shibuya, M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies', *Genes & Cancer*, 2(12), pp. 1097–1105. doi: 10.1177/1947601911423031.

Sperroff, L., Fritz, M.A. 2005. *Female Infertility in: Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility.* Seventh Edition. Philadelphia, PA : Lippincott Williams and Wilkins.p. 1014-1019.

Sperroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. 1999. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility ; Lippincott Williams and Wilkins.* Edisi 6. p52-66.

Sugijati., Karnasi., Palupi, J. 2015. Endometrial Angiogenesis On Guinea Pig (*Musmusculus*) With Smoke Exposure. *IOSR Journal of Nursing and Health Science (IOSR-JNHS)* e-ISSN: 2320–1959.p- ISSN: 2320–1940 Volume 4, Issue 2 Ver. V (Mar.-Apr. 2015), PP 33-37 www.iosrjournals.org.

Soares, R.S and Melo, A.M. 2008. Cigarette smoking and reproductive function. Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI-Lisboa, Lisbon, Portugal and Instituto Valenciano de Infertilidad, Instituto Universitario IVI, Valencia, Spain

Ucuzian, A.A., Gassman, A.A., East, T.A., Greisler, P.H. 2010. Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*, vol. 31, issue 1 (2010) pp. 158-175 Published by NIH Public Access.

WHO. 2012. Konsensus Penanganan Infertilitas Tahun 2013.

Wahl, A.E., Schenck, L.T., Machens, G.H., Egana, T.J. '2Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation and paracrine potential', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 22957. doi: 10.1038/srep22957.016.

Wellness, B. 2014. How Antioxidant Work. *Originally Published*. University Of California.

Westwood, R.F. 2008. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging', *Toxicologic Pathology*, 36(3), pp. 375–384. doi: 10.1177/0192623308315665.

Widodo, M.A., Sutjiati, E., Arestha, Y.D. 2011. Pengaruh pemberian ekstrak daun kelor terhadap jumlah eritrosit pada tikus wistar yang dipapar asap rokok.

Yoo, Y.S., Kwon, M.S. 2013. Angiogenesis and its therapeutic opportunities', *Mediators of Inflammation*, 2013(1). doi: 10.1155/2013/127170.

Yoshikawa, T., and Naito, Y. 2002. 'What is oxidative stress?', *Japan Medical Association Journal*, 45(7), pp. 271–276. doi: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3.

Yuwono, S.S. 2016. Tanaman Bit (Beta vulgaris L.). Universitas Brawijaya.

RIWAYAT HIDUP

Zulfa Hanum, lahir Meunasah Timu, 09 Desember 1989, anak pertama dari empat bersaudara, putri dari bapak Dahlan, SE dan ibu Rosdiana. Menikah dengan Novanda, S.Pd. Lulus MIN 1 Peusangan tahun 2001, lulus SMP Negeri 1 Peusangan tahun 2004 dan lulus SMA Negeri 2 Peusangan tahun 2007.



Melanjutkan pendidikan Diploma III Kebidanan Universitas Almuslim, lulus tahun 2010. Melanjutkan pendidikan Diploma IV Bidan Klinik di Poltekkes Kemenkes Aceh dan lulus tahun 2012. Pada tahun 2016 mengambil pendidikan Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2012 sampai sekarang penulis bekerja sebagai dosen di Program Diploma III Kebidanan Universitas Almuslim Matangglumpangdua, Bireuen, Aceh.



Lampiran 1 : Surat Keterangan Kelaikan Etik



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

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

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 26 / EC / KEPK – S2 / 02 / 2018

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

JUDUL : Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) terhadap Ovarium, Uterus, Kadar Hormon FSH dan 17^{β} Estradiol pada Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok.

PENELITI UTAMA : Intyaswati
Zulfa Hanum
Dewita
Lianita Primi Octaviana
Sekar Handayani

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

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang,
Ketua,

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.
NIK. 160746683

Catatan :

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

Lampiran 2 : Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 288 /UN10.F08.08/PN/2018

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

- Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Dan Jumlah Arteriole Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Asap Rokok
- Penulis : Zulfa Hanum
- NIM : 166070400111008
- Jumlah Halaman : 81
- Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)
- Kemiripan : 3 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

04 JUN 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



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





Window of Health (WoH): Jurnal Kesehatan Pusat Kajian dan Pengelola Jurnal Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Muslim Indonesia



ISSN 2614 – 5375

Cell: 085255997212 - 082346913176 | Website: <http://jurnal.fkmumi.c.id> | E-mail: jurnal.woh@gmail.com

Kepada YTH

Zulfa Hanum, Dewita, Kusworini Handono, Nurdiana, Endang Sriwahyuni

Universitas Brawijaya Malang

LETTER OF ACCEPTANT

Nomor : 040/PKPJ/FKM-UMI/VI/2018

Window of Health (WoH) : Jurnal Kesehatan ingin memberitahu Anda bahwa paper Anda yang berjudul : **Pengaruh Ekstrak Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap VEGF, dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Dipapar Asap Rokok** telah diterima untuk dipublikasikan pada WoH : Jurnal Kesehatan Volume 1, Nomor 3 (Juli, 2018) with Journal Code No : **WoH1301**

Mengingat bahwa tidak ada manuskrip atau sesuatu yang secara substansi dengan konten serupa yang akan diterbitkan dan juga tidak sedang dipertimbangkan untuk dipublikasikan ditempat lain, kecuali seperti yang dijelaskan.

Proses Biaya Publikasi

| Kode Paper | Judul Paper | Jenis Papers | Biaya (Rp) |
|-------------|--|--------------|------------|
| WoH1210 | Pengaruh Ekstrak Bit Merah (<i>Beta vulgaris L.</i>) Terhadap VEGF, dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Dipapar Asap Rokok | Article | 300.000 |
| TOTAL BIAYA | | | 300.0 |

Semua biaya pemrosesan harus melalui transfer uang sebagai berikut:

Nama Bank : Bank Syariah Mandiri (BSM)
 Nama Rekening : PKPJFKMUMI
 No. Rekening : 7777201888
 Alamat : Jl.Urip Sumohardjo KM.05 KAMPUS II UMI Makassar, Sulsel, Indonesia.

Terima kasih telah memasukan artikel anda. Kami menantikan publikasi anda selanjutnya.

Hormat Kami

Pusat Kajian dan Pengelola Jurnal FKM UMI



Dr. Yusriani, SKM., M.Kes

Window of Health (WoH)
"Pusat Kajian dan Pengelola Jurnal Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Muslim Indonesia"

Lampiran 4 : Dokumentasi Penelitian



➔ Buah bit merah yang sudah bisa dipanen, dengan usia lebih kurang 2 bulan



➔ Bit merah yang dikeringkan dibawah cahaya matahari, guna untuk mengurangi kadar air dalam buah bit. Proses ini dilakukan di Materia Medika Batu Malang.



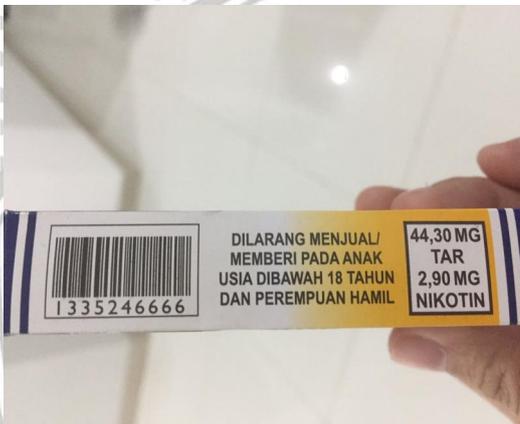
➔ Bit kering yang diolah menjadi simplisia dengan cara diblender kering. Hasilnya menjadi 935 gram dari 15 kilogram bit mentah



➔ Bit kering (simplisia) kemudian di ekstrak dengan proses maserasi dan hasil ekstrak pertama berjumlah 55 gram, kemudian dimaserasi ulang dan didapatkan penambahan ekstrak 22 gram. Jadi jumlah ekstrak sebanyak 77 gram dari 500 gram simplisia.



Smoking pump adalah alat yang digunakan untuk memapar asap rokok untuk tikus.



Rokok yang digunakan merupakan rokok kretek.



Proses menimbang rokok guna untuk melihat berat rokok setiap batangnya.



⇒ Kandang yang digunakan untuk memelihara tikus



⇒ Makanan dan minuman tikus



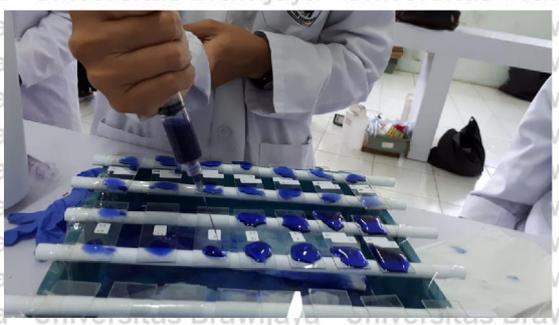
⇒ Menimbang pakan tikus, pakan yang diberikan berjumlah 40 gram/hari



Proses apusan vagina hewan coba menggunakan *cotton bath*



Apusan tersebut dioleskan ke *objec glass* yang telah disediakan



Objec glass yang terdapat apusan vagina hewan coba ditetaskan gimsa

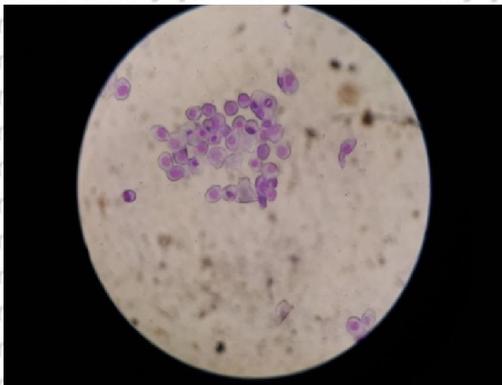




Objec glass yang telah ditetes gimsa kemudia dicuci dibawah air mengalir



Setelah objec glass kering, kemudian objec glass diamati dibawah mikroskop untuk melihat fase yang sedang dialami oleh tikus



Ini adalah gambar dimana tikus berada pada fase proestrus yang ditandai dengan sel yang menumpuk dan berinti



Tikus sudah dianatesi dan diletakkan diatas papan bedah



Proses pengambilan organ uterus hewan coba



Organ uterus kemudian ditimbang dan dimasukkan kedalam botol yang sudah diberikan larutan formalin 10%. Kemudian organ dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi untuk dibuat preparat

Lampiran 5 : Hasil Uji Normalitas Data

Tests of Normality

| | kelompok pengamatan | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|---------------------------|---------------------------------|------|-------|--------------|------|------|
| | | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| ekspresi VEGF (%) | kontrol (-) | .204 | 5 | .200* | .977 | 5 | .920 |
| | kontrol (+) | .311 | 5 | .128 | .833 | 5 | .147 |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | .250 | 5 | .200* | .904 | 5 | .431 |
| | PII (250 mg/KgBB/hari) | .209 | 5 | .200* | .925 | 5 | .563 |
| | PIII (500 mg/KgBB/hari) | .170 | 5 | .200* | .967 | 5 | .855 |
| | jumlah Arteriole (satuan) | kontrol (-) | .241 | 5 | .200* | .903 | 5 |
| | kontrol (+) | .269 | 5 | .200* | .894 | 5 | .376 |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | .254 | 5 | .200* | .914 | 5 | .492 |
| | PII (250 mg/KgBB/hari) | .300 | 5 | .161 | .883 | 5 | .325 |
| | PIII (500 mg/KgBB/hari) | .244 | 5 | .200* | .871 | 5 | .272 |

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

a. Lilliefors Significance Correction



Lampiran 6 : Hasil Uji Perbandingan Kelompok Kontrol

1. Hasil uji perbandingan data ekspresi VEGF

T-Test

Group Statistics

| | kelompok pengamatan | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|-------------------|---------------------|---|--------|----------------|-----------------|
| ekspresi VEGF (%) | kontrol (-) | 5 | 26.580 | 1.1520 | .5152 |
| | kontrol (+) | 5 | 16.920 | 2.8394 | 1.2698 |

Independent Samples Test

| | | ekspresi VEGF (%) | |
|---|---|-------------------------|-----------------------------|
| | | Equal variances assumed | Equal variances not assumed |
| Levene's Test for Equality of Variances | F | 1.581 | |
| | Sig. | .244 | |
| t-test for Equality of Means | t | 7.049 | 7.049 |
| | df | 8 | 5.282 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | .001 |
| | Mean Difference | 9.6600 | 9.6600 |
| | Std. Error Difference | 1.3703 | 1.3703 |
| | 95% Confidence Interval of the Difference | Lower 6.5000 | 6.1933 |
| | | Upper 12.8200 | 13.1267 |

2. Hasil uji perbandingan data jumlah Arteriole

T-Test

Group Statistics

| | kelompok pengamatan | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---------------------------|---------------------|---|-------|----------------|-----------------|
| jumlah Arteriole (satuan) | kontrol (-) | 5 | 2.760 | .2702 | .1208 |
| | kontrol (+) | 5 | 1.820 | .2588 | .1158 |

Independent Samples Test

| | | jumlah Arteriole (satuan) | |
|---|---|---------------------------|-----------------------------|
| | | Equal variances assumed | Equal variances not assumed |
| Levene's Test for Equality of Variances | F | .023 | |
| | Sig. | .883 | |
| t-test for Equality of Means | t | 5.618 | 5.618 |
| | df | 8 | 7.985 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | .001 |
| | Mean Difference | .9400 | .9400 |
| | Std. Error Difference | .1673 | .1673 |
| | 95% Confidence Interval of the Difference | Lower .5541 | .5540 |
| | | Upper 1.3259 | 1.3260 |

Lampiran 7 : Hasil Uji Perbandingan Kelompok Perlakuan Pada Data Ekspresi VEGF

Oneway

Descriptives

ekspresi VEGF (%)

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| kontrol (-) | 5 | 26.580 | 1.1520 | .5152 | 25.150 | 28.010 | 24.9 | 28.0 |
| kontrol (+) | 5 | 16.920 | 2.8394 | 1.2698 | 13.394 | 20.446 | 12.1 | 19.5 |
| PI (125 mg/KgBB/hari) | 5 | 21.200 | 1.6047 | .7176 | 19.208 | 23.192 | 18.6 | 22.9 |
| PII (250 mg/KgBB/hari) | 5 | 22.800 | .9138 | .4087 | 21.665 | 23.935 | 21.8 | 23.9 |
| PIII (500 mg/KgBB/hari) | 5 | 25.840 | 1.3885 | .6210 | 24.116 | 27.564 | 24.3 | 27.9 |
| Total | 25 | 22.668 | 3.8826 | .7765 | 21.065 | 24.271 | 12.1 | 28.0 |

ANOVA

ekspresi VEGF (%)

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 302.886 | 4 | 75.722 | 25.708 | .000 |
| Within Groups | 58.908 | 20 | 2.945 | | |
| Total | 361.794 | 24 | | | |



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ekspresi VEGF

| | (I) kelompok pengamatan | (J) kelompok pengamatan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| LSD | kontrol (-) | kontrol (+) | 9.6600* | 1.0854 | .000 | 7.396 | 11.924 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | 5.3800* | 1.0854 | .000 | 3.116 | 7.644 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | 3.7800* | 1.0854 | .002 | 1.516 | 6.044 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | .7400 | 1.0854 | .503 | -1.524 | 3.004 |
| | kontrol (+) | kontrol (-) | -9.6600* | 1.0854 | .000 | -11.924 | -7.396 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | -4.2800* | 1.0854 | .001 | -6.544 | -2.016 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | -5.8800* | 1.0854 | .000 | -8.144 | -3.616 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -8.9200* | 1.0854 | .000 | -11.184 | -6.656 |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | -5.3800* | 1.0854 | .000 | -7.644 | -3.116 |
| | | kontrol (+) | 4.2800* | 1.0854 | .001 | 2.016 | 6.544 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | -1.6000 | 1.0854 | .156 | -3.864 | .664 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -4.6400* | 1.0854 | .000 | -6.904 | -2.376 |
| | PII (250 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | -3.7800* | 1.0854 | .002 | -6.044 | -1.516 |
| | | kontrol (+) | 5.8800* | 1.0854 | .000 | 3.616 | 8.144 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | 1.6000 | 1.0854 | .156 | -.664 | 3.864 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -3.0400* | 1.0854 | .011 | -5.304 | -.776 |
| | PIII (500 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | -.7400 | 1.0854 | .503 | -3.004 | 1.524 |
| | | kontrol (+) | 8.9200* | 1.0854 | .000 | 6.656 | 11.184 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | 4.6400* | 1.0854 | .000 | 2.376 | 6.904 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | 3.0400* | 1.0854 | .011 | .776 | 5.304 |

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

Test of Homogeneity of Variances

ekspresi VEGF

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .996 | 4 | 20 | .433 |

Lampiran 8 : Hasil Uji Perbandingan Kelompok Perlakuan Pada Data Jumlah Arteriole

Oneway

Descriptives

jumlah Arteriole (satuan)

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| kontrol (-) | 5 | 2.760 | .2702 | .1208 | 2.425 | 3.095 | 2.5 | 3.2 |
| kontrol (+) | 5 | 1.820 | .2588 | .1158 | 1.499 | 2.141 | 1.4 | 2.1 |
| PI (125 mg/KgBB/hari) | 5 | 2.160 | .1517 | .0678 | 1.972 | 2.348 | 2.0 | 2.4 |
| PII (250 mg/KgBB/hari) | 5 | 2.400 | .0707 | .0316 | 2.312 | 2.488 | 2.3 | 2.5 |
| PIII (500 mg/KgBB/hari) | 5 | 2.880 | .2168 | .0970 | 2.611 | 3.149 | 2.7 | 3.2 |
| Total | 25 | 2.404 | .4392 | .0878 | 2.223 | 2.585 | 1.4 | 3.2 |

ANOVA

jumlah Arteriole (satuan)

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 3.770 | 4 | .942 | 21.916 | .000 |
| Within Groups | .860 | 20 | .043 | | |
| Total | 4.630 | 24 | | | |



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah Arteriole

| | (I) kelompok pengamatan | (J) kelompok pengamatan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| LSD | kontrol (-) | kontrol (+) | .9400* | .1311 | .000 | .666 | 1.214 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | .6000* | .1311 | .000 | .326 | .874 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | .3600* | .1311 | .012 | .086 | .634 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -.1200 | .1311 | .371 | -.394 | .154 |
| | kontrol (+) | kontrol (-) | -.9400* | .1311 | .000 | -1.214 | -.666 |
| | | PI (125 mg/KgBB/hari) | -.3400* | .1311 | .017 | -.614 | -.066 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | -.5800* | .1311 | .000 | -.854 | -.306 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -1.0600* | .1311 | .000 | -1.334 | -.786 |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | -.6000* | .1311 | .000 | -.874 | -.326 |
| | | kontrol (+) | .3400* | .1311 | .017 | .066 | .614 |
| | | PII (250 mg/KgBB/hari) | -.2400 | .1311 | .082 | -.514 | .034 |
| | | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -.7200* | .1311 | .000 | -.994 | -.446 |
| PII (250 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | -.3600* | .1311 | .012 | -.634 | -.086 | |
| | kontrol (+) | .5800* | .1311 | .000 | .306 | .854 | |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | .2400 | .1311 | .082 | -.034 | .514 | |
| | PIII (500 mg/KgBB/hari) | -.4800* | .1311 | .002 | -.754 | -.206 | |
| PIII (500 mg/KgBB/hari) | kontrol (-) | .1200 | .1311 | .371 | -.154 | .394 | |
| | kontrol (+) | 1.0600* | .1311 | .000 | .786 | 1.334 | |
| | PI (125 mg/KgBB/hari) | .7200* | .1311 | .000 | .446 | .994 | |
| | PII (250 mg/KgBB/hari) | .4800* | .1311 | .002 | .206 | .754 | |

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

Test of Homogeneity of Variances

jumlah Arteriole

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 1.362 | 4 | 20 | .283 |



Lampiran 9 : Hasil Uji Normalitas Data Dosis Ekstrak Bit Merah

Explore

Warnings

dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = P1. It will be included in any boxplots produced but other output will be omitted.
 dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = P2. It will be included in any boxplots produced but other output will be omitted.
 dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = P3. It will be included in any boxplots produced but other output will be omitted.

kelompok perlakuan

Case Processing Summary

| | kelompok perlakuan | Cases | | | | | |
|---|--------------------|-------|---------|---------|---------|-------|---------|
| | | Valid | | Missing | | Total | |
| | | N | Percent | N | Percent | N | Percent |
| dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) | PI | 5 | 100.0% | 0 | 0.0% | 5 | 100.0% |
| | PII | 5 | 100.0% | 0 | 0.0% | 5 | 100.0% |
| | PIII | 5 | 100.0% | 0 | 0.0% | 5 | 100.0% |

Tests of Normality^{a,b,c}

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

- a. dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = PI. It has been omitted.
- b. dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = PII. It has been omitted.
- c. dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) is constant when kelompok perlakuan = PIII. It has been omitted.

Lampiran 10 : Hasil Uji Korelasi

Nonparametric Correlations

Correlations

| | | | dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) | ekspresi VEGF (%) | jumlah Arteriole (satuan) |
|----------------|---|-------------------------|---|-------------------|---------------------------|
| Spearman's rho | dosis ekstrak etanol bit merah (mg/kgBB/Hari) | Correlation Coefficient | 1.000 | .880** | .907** |
| | | Sig. (2-tailed) | . | .000 | .000 |
| | | N | 15 | 15 | 15 |
| | ekspresi VEGF (%) | Correlation Coefficient | .880** | 1.000 | .801** |
| | | Sig. (2-tailed) | .000 | . | .000 |
| | | N | 15 | 15 | 15 |
| | jumlah Arteriole (satuan) | Correlation Coefficient | .907** | .801** | 1.000 |
| | | Sig. (2-tailed) | .000 | .000 | . |
| | | N | 15 | 15 | 15 |

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



Lampiran 11 : Permohonan Melakukan Penelitian

Hal : Permohonan melakukan Penelitian

Kepada Yth.
Kepala Laboratorium
Farmakologi Fak. Kedokteran
Univ. Brawijaya Malang

Lamp : 1 Bendel Proposal Penelitian & ETIK

Dengan hormat,

Yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Zulfo Honum
 N I M / NIP : 166070900111008
 PS (S1,S2,S3/Ummum) : Magister Kebidanan FKUB
 Alamat asal : Jln. Medan. 8. Aceh Dusun Almuslim Desa Pajay Cut .Kec. Aeusanton . Aceh
 Telpon : 081167002790
 Alamat kost : Jln. Jakarta dalam no. 112 A
 Judul Penelitian : Pengaruh ekstrak etanol bit merah (Beto Vulgonis L.) terhadap ekspresi Vaskuler endothelial growth factor (VEGF) dan jumlah sitokin endometrium pada tikus (Rattus norvegicus) yang dipapar asap rokok.
(Proposal terlampir)
 Pembimbing : Prof. DR. Dr. Kuswaini Handono, M.Kes, SpPK
 Keperluan : 1. Uji Ekstrak 2. Pemeriksaan MDA/SOD
 3. Pemeliharaan & Pelakuan Hewan Coba
 Alat yang digunakan : Sigaret Pump, alat pemeliharaan, timbangan digital.

Mohon agar kami diijinkan untuk melakukan penelitian di Lab. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya terhitung mulai tanggal :
.....Januari.....s/d.....Maret.....2018

Kami akan mematuhi segala peraturan dan tata tertib yang berlaku di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Demikian, atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Kepala Lab. Farmakologi
FK-Universitas Brawijaya

Pembimbing,

Malang, 08 Januari.....201
Pemohon,

Dr. dr. Umi Kaksum, M.Kes
NIP. 19550512 198701 2 001

Prof. DR. Dr. Kuswaini Handono, M.Kes SpPK

(Zulfo Honum)



Lampiran 12 : Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Farmakologi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
LABORATORIUM FARMAKOLOGI

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 569117, 567192 Ext. 110 - Fax. (62) (0341) 564755
<http://fk.ub.ac.id/labfarmako> e-mail : farmako.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN
Nomor : 39/UN10.F08.46/2018

Dengan ini Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, menerangkan bahwa :

N A M A : Zulfa Hanum
NIM : 166070400111008
JURUSAN / PROGRAM : S-2 Kebidanan FKUB

Benar – benar telah melaksanakan penelitian sesuai prosedur yang berlaku dengan :

Judul : Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L*) Terhadap Ekspresi Vaskuler Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium Pada Tikus (*rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok
Pelaksanaan : Januari 2018 – Maret 2018
Tempat : Laboratorium Farmakologi FKUB

Demikian, surat ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 9 Juli 2018
Kepala Lab. Farmakologi FKUB,

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 19550512 198701 2 001

Lampiran 13 : Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Sentral Biomedik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN
Nomor : 05/UN10.F08.41/PN/2018

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Dr.rer.nat. Tri Yudani M.R., M.App.Sc.
NIP : 196511051993032001
Pangkat dan golongan : Penata/III-d/Lektor Kepala
Jabatan : Kepala Laboratorium Sentral Biomedik

dengan ini menerangkan bahwa,

Nama : Zulfa Hanum
NIM : 166070400111008
Jurusan/Program Studi : Magister Kebidanan
Fakultas/Universitas : Kedokteran/Brawijaya
Judul Penelitian : Pengaruh Ekstraksi Bit Merah (Beta Vulgaris L) terhadap Ekspresi Vasculer Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium pada Tikus (Rattus Norvegicus) yang Dipapar Asap Rokok

telah menyelesaikan penelitian (Imunohistokimia) dan tanggungan biaya administrasi di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Demikian surat keterangan ini kami buat agar dipergunakan, sebagaimana mestinya.



Malang, 15 JUL 2018
Kepala Laboratorium Sentral Biomedik
Dr.rer.nat. Tri Yudani M.R., MApp.Sc.
NIP 196511051993032001



Lampiran 14 : Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PERGURUAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMIK

Jalan Veteran - Kampus Universitas Brawijaya Malang - 65145
Tlp. (0341) 569117 , 567192 , 580993 .Ex. (121) - Fax. (0341) 564755
Laboratorium Patologi Anatomi
(E-Mail PA : pa_fkub@yahoo.com / pa_fk@ub.ac.id)

Yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : dr. Kenty Wantri Anita, Mkes, SpPA
NIP : 197207151999032002
Jabatan Struktural : Kepala Laboratorium Patologi Anatomi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa mahasiswa tersebut dibawah ini :

Nama : Zulfa Hanum
NIM : 166070400111008
Program Studi : Magister Kebidanan FKUB
Judul Penelitian : Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Ekspresi Vaskuler Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Asap Rokok

Adalah benar-benar melakukan penelitian, menggunakan peralatan dan fasilitas yang ada di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



9 Juli 2018
Patologi Anatomi FKUB

dr. Kenty Wantri Anita, Mkes, SpPA
NIP. 197207151999032002

Lampiran 15 : Surat Keterangan Pembacaan Histologi dan Immunohistokimia Endometrium

Surat Keterangan Konsul Pembacaan Histologi dan Immunohistokimia Endometrium

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa mahasiswa dengan :

- Nama : Zulfa Hanum
- NIM : 166070400111008
- Program Studi : S2 Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Judul Tesis : Pengaruh Ekstrak Etanol Bit Merah (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Ekspresi Vaskuler Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Jumlah Arteriole Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Asap Rokok

Adalah benar telah melakukan konsultasi pada saya di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Demikian pemberitahuan ini saya perbuat dan digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, Mei 2018

Peneliti



Zulfa Hanum



dr. Kenty Wantri A. M.Kes. Sp.PA
NIP 197207151999032002