

**PENGARUH PEMBERIAN EXTRA VIRGIN OLIVE OIL  
(EVOO) TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR  
ESTROGEN  $\alpha$  DAN KETEBALAN ENDOMETRIUM  
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR  
RHODAMIN B**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:  
ITA NOVIASARI  
166070400111032**

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













Karya ilmiah ini kutujukan kepada  
Kedua orang tuaku  
Suamiku  
Kedua putriku

Terima kasih atas segenap cinta

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayahNya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  dan Ketebalan Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Rhodamin B”**.

Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kajian tentang *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO), Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$ , Ketebalan Endometrium, Rhodamin B. Dengan tulus hati dan rasa syukur saya sampaikan terima kasih kepada pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Pendidikan Tinggi (DikTi) yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program Pascasarjana Universitas Brawijaya melalui program Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia-Dalam Negeri (BUDI-DN).

Dengan selesanya tesis ini penulis menyampaikan rasa hormat, terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, M.S selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang Periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas 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, atas izin yang diberikan selama penulis dapat

menempuh pendidikan 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 yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

5. Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K) selaku pembimbing I yang telah memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan selama penyusunan tesis.

6. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan semangat, bimbingan dan arahan selama penyusunan tesis.

7. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSi selaku penguji I yang telah banyak memberikan masukan dan arahan untuk kesempurnaan penyusunan tesis ini.

8. Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes selaku penguji II yang telah memberikan masukan, arahan, dan teknik penulisan untuk kesempurnaan penyusunan tesis ini.

9. dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA (K) selaku konsultan histologi endometrium.

10. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, atas bantuan fasilitas yang diberikan.

11. dr. Kenty Wantri Anita, M.Kes, Sp.PA selaku Kepala Laboratorium Patologi Anatomi, atas bantuan fasilitas yang diberikan.

12. Seluruh Dosen Pengajar Program Studi Magister Kebidanan yang telah mendidik, membimbing dan memberikan bekal ilmunya.

13. Kedua orang tua, suami dan kedua putri yang selalu memberikan dukungan penuh untuk kesuksesan ini.

14. Teman-teman 1 tim penelitian, Siti Anisak, Fera Yuli Setyaningsih dan Huda Rohmawati atas *support* dan segala bantuannya.

15. Teman-teman magister kebidanan angkatan tahun 2016 yang telah berjuang bersama menempuh pendidikan dan menyelesaikan tesis ini.

Sangat disadari adanya kekurangan dan keterbatasan penulis, sehingga penulisan ini banyak terdapat kekurangan dan keterbatasan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2018

Penulis



## RINGKASAN

**Ita Noviasari**

Pengaruh Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  dan Ketebalan Endometrium pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Rhodamin B, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K); Anggota: dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M.

Pangan adalah komoditi utama dalam pemenuhan kebutuhan hidup. Salah satu tambahan dalam pangan adalah zat pewarna. Warna menarik biasanya menjadi prioritas utama dalam produksi makanan. Namun banyak pangan yang diproduksi berupa jajanan yang diberi zat pewarna yang bukan zat pewarna alami yang diperoleh dari pigmentasi tanaman, tetapi zat pewarna sintesis yang dilarang yaitu rhodamin B.

Rhodamin B berbahaya mengandung senyawa klorin (Cl). Senyawa klorin merupakan senyawa halogen yang berbahaya dan reaktif. Jika tertelan, maka senyawa ini akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara mengikat senyawa lain dalam tubuh, hal inilah yang bersifat racun bagi tubuh. Selain itu, Rhodamin B juga memiliki senyawa pengalkilasi (CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>) yang bersifat radikal sehingga dapat berikatan dengan protein, lemak, dan DNA dalam tubuh.

Siklus kesuburan wanita sangat dipengaruhi oleh hormone LH dan FSH yang dihasilkan oleh hipofisis anterior. Hormon FSH merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium dan folikel yang sedang tumbuh ini mensekresikan hormone estrogen. Pada saat terjadinya lonjakan dari hormone estrogen, hipofisis anterior akan meningkatkan sekresi hormone LH sehingga akan terjadi ovulasi. Setelah ovulasi LH akan merangsang jaringan folikel yang tertinggal di ovarium, untuk membentuk korpus luteum yang akan mensekresikan hormone progesteron. Hormon progesteron ini akan merangsang penebalan dinding endometrium untuk mempersiapkan kehamilan jika terjadi pembuahan.

Kerusakan pada hipotalamus akan mengganggu sekresi FSH dan LH sehingga menyebabkan pematangan folikel terganggu yang berakibat pada penurunan hormone estrogen. Hormon estrogen berperan penting dalam siklus menstruasi dan proliferasi endometrium. Hormon estrogen dibentuk oleh sel granulosa pada saat fase folikuler. Stimulasi estrogen meningkatkan ukuran dan jumlah sel di myometrium dan endometrium yang disertai dengan tahapan pembentukan reseptor estrogen yang spesifik dan proses sintesa protein. Pengaruh hormone estrogen akan menstimulasi sel epitel dan stroma endometrium berproliferasi dan meningkatkan ketebalan endometrium. Hormon estrogen yang masuk ke dalam sel target akan berikatan dengan reseptor estrogen yang berada di inti dan menyebabkan reseptor estrogen menjadi aktif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium pada tikus yang dipapar rhodamin B. Penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design*, menggunakan sampel 25 ekor tikus betina yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok kontrol positif (Rhodamin B 18 mg/200 g BB/hari), P1 (Rhodamin B 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 1,5 mL/KgBB/hari), PII (Rhodamin B 18 mL/200 g BB/hari + EVOO 3 mL/KgBB/hari), PIII (Rhodamin B 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 4,5 mL/KgBB/hari).

*Extra Virgin olive Oil* berpengaruh signifikan terhadap ketebalan endometrium dengan nilai signifikansi (0.002) lebih kecil dari 0.05. Koefisien yang positif artinya *Extra Virgin olive Oil* dapat meningkatkan ketebalan endometrium secara signifikan. Dengan besar kontribusi pengaruhnya terhadap ketebalan endometrium sebesar 41.2%.

Korelasi antara *Extra Virgin olive Oil* dengan ketebalan endometrium menunjukkan hubungan positif yang signifikan dengan nilai signifikansi (0.005) lebih kecil dari 0.05. Dengan angka korelasi 0.605 termasuk hubungan yang cukup tinggi. Hubungan yang

seiring antara pemberian *Extra Virgin olive Oil* dengan peningkatan ketebalan endometrium *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B disebabkan oleh kandungan *Extra Virgin olive Oil* yang menetralsir oksidan berlebih di dalam tubuh yang bisa merusak fungsi dari organ reproduksi.

*Extra Virgin Olive Oil* dapat meningkatkan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium *Rattus norvegicus* yang dipapar Rhodamin B. *Extra Virgin Olive Oil* mempengaruhi ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium *Rattus norvegicus* yang dipapar Rhodamin B.



## SUMMARY

**Ita Noviasari**

The Effectiveness of Extra Virgin Olive Oil (EVOO) to the expression of Estrogen receptors  $\alpha$  and the thickness of the Endometrium in rats (*Rattus norvegicus*), exposed by Rhodamin B. Midwifery master's degree Courses, Faculty of Medicine University of Brawijaya. Chairman of Supervisor Commission: Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K); Member: dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M

Food is the main commodity in the fulfillment of the necessities of life. One of the food additive is the substance of the dye. Attractive colors usually become a top priority in the production of food. Much of the food produced in the form of a hawker is given a dye substance rather than the substance of natural dyes obtained from plant pigmentation, but the synthesis of dyes was banned substances namely rhodamin B.

Rhodamin B is harmful to human health due to the nature of the chemical and metal content of severity. Rhodamin B contains compounds of chlorine (Cl). A compound of chlorine is a dangerous and halogen compounds are reactive. If ingested, then it will try to achieve stability in the body by way of binding other compounds in the body. This substance is poisonous to the body. In addition, Rhodamin B also has alkalized compounds (CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>) which are radically can bind with proteins, fats and DNA in the body.

The female fertility cycle is strongly influenced by LH and FSH hormones produced by the anterior pituitary. The FSH hormone stimulates the growth of follicles in the ovaries and this growing follicle secretes the hormone estrogen. At the time of the surge of the hormone estrogen, the anterior pituitary will increase the secretion of LH hormones that will occur in ovulation. After ovulation LH will stimulate the follicle tissue left in the ovary, to form a corpus luteum that will secrete the hormone progesterone. This progesterone hormone will stimulate the thickening of the endometrial wall to prepare for pregnancy in the event of fertilization.

Damage to the hypothalamus will interfere with the secretion of FSH and LH cause the follicle ripening so distracted that result in a decrease in the hormone estrogen. The estrogen hormone plays an important role in the menstrual cycle and the proliferation of endometrial. Estrogen hormones are formed by the cells of the follicular phase at the time granulosa. Stimulation of estrogen increase the size and number of cells in the myometrium and endometrium are accompanied with the stages of the formation of specific estrogen receptor and the process of synthesis of proteins. The influence of the estrogen hormone stimulates endometrial stromal and epithelial cells conducts proliferate and increase the thickness of the endometrium. The estrogen hormone that goes into target cells will bind to estrogen receptors that are located in the nucleus and menyebabkan estrogen receptors become active.

This research aimed to know the effectiveness of Extra Virgin Olive Oil against the expression of estrogen receptors  $\alpha$  and the thickness of the endometrium in rats exposed by rhodamin b. The design of the research was experimental with post-test only control group design, The sample was 25 female rats divided into 5 groups. The negative control group (without treatment), positive control group (Rhodamin B 18 mg/200 g w/day), PI (Rhodamin B 18 mg/200 g w/day + 1.5 mg/EVOO KgBB/day), PII (Rhodamin B 18 mg/200 g w/EVOO days + 3 mg/KgBB/day), PIII Rhodamin B (18 mg/200 g w/EVOO day + 4.5 KgBB/mg/day).

Extra Virgin olive Oil effected significantly to the thickness of the endometrium with value 0,002 is less than 0,05. A positive coefficient mean Extra Virgin olive Oil might increase endometrial thickness significantly. With a large contribution to its effects on the endometrial thickness of 41.2%.

The correlation between Extra Virgin olive Oil with endometrial thickness showed significant positive relationship with value 0,005 less than 0.05. With the number of relationships including 0.605 correlation was quite high. The correlation between Extra

Virgin olive Oil with an increase in the thickness of the endometrium *Rattus norvegicus* which exposed by rhodamin B caused by deposits of Extra Virgin olive Oil that act as antioxidants that neutralize the oxidants any excess in the body that biased damage the function of the reproductive organs.

Extra Virgin Olive Oil might increase the expression of estrogen  $\alpha$  receptors and endometrial thickness of *Rattus norvegicus* exposed to Rhodamin B. Extra Virgin Olive Oil might affect the expression of estrogen  $\alpha$  receptor and endometrial thickness of *Rattus norvegicus* exposed to Rhodamin B.



DAFTAR ISI

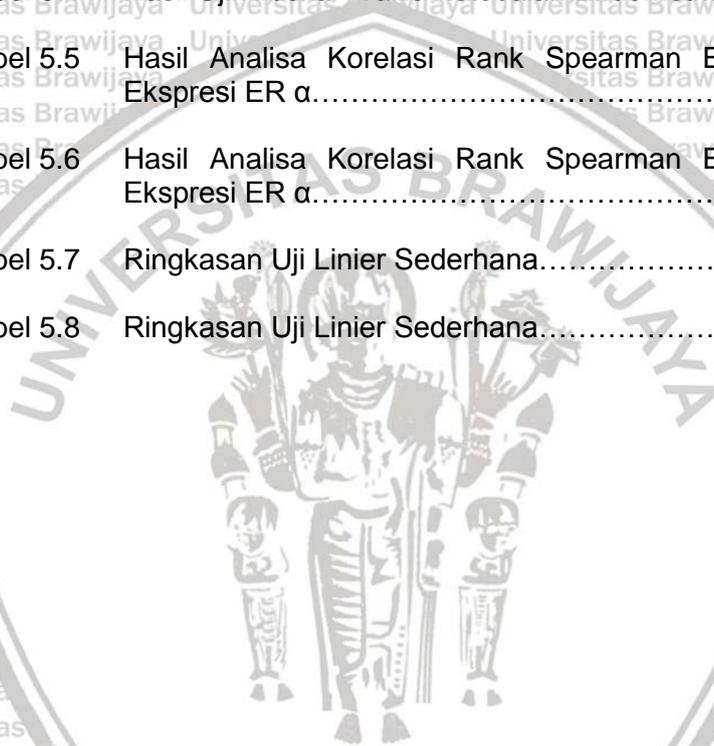
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN.....	ix
SUMMARY.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.1 Rumusan Masalah.....	4
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Radikal Bebas dan Stres Oksidatif.....	6
2.2 Rhodamin B.....	11
2.3 <i>Extra Virgin Olive Oil</i> .....	15
2.4 Reseptor estrogen.....	24
2.5 Endometrium.....	29
2.6 Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	37
2.7 Kerangka Teori Penelitian.....	43
BAB 3 KERANGKA KONSEP.....	44
3.1 Kerangka Konsep.....	44
3.2 Hipotesis Penelitian.....	47



BAB 4 METODE PENELITIAN.....	48
4.1 Rancangan Penelitian.....	48
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	48
4.3 Sampel Penelitian.....	49
4.4 Variabel Penelitian.....	50
4.5 Definisi Operasional.....	51
4.6 Prosedur Penelitian.....	53
4.7 Analisa Data.....	62
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	62
5.1 Karakteristik Subjek.....	62
5.2 Hasil Pengukuran Ekspresi Reseptor Estrogen $\alpha$ pada <i>Rattus norvegicus</i> yang Diberikan <i>Extra Virgin Olive Oil</i> dan Dipapar Rhodamin B.....	63
5.3 Hasil Pengukuran Ketebalan Endometrium pada <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> yang diberikan <i>Extra Virgin Olive Oil</i> dan dipapar Rhodamin B.....	64
5.4 Hasil Analisis Ekspresi Reseptor Estrogen $\alpha$ .....	65
5.5 Hasil Analisis Ketebalan Endometrium.....	68
5.6 Hasil Analisis Koefisien Korelasi.....	70
5.7 Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana.....	72
BAB 6 PEMBAHASAN.....	76
6.1 Pengaruh Pemberian <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO) terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen $\alpha$ (ER $\alpha$ ) pada <i>Rattus</i> <i>norvegicus</i> yang dipapar Rhodamin B.....	76
6.2 Pengaruh Pemberian <i>Extra Virgin Olive Oil</i> (EVOO) terhadap Ketebalan Endometrium <i>Rattus Norvegicus</i> yang dipapar Rhodamin B.....	80
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	85
7.1 Kesimpulan.....	85
7.2 Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA.....	86
LAMPIRAN.....	91
RIWAYAT HIDUP.....	110

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Definisi Operasional .....	51
Tabel 5.1	Rata-rata Ekspresi ER $\alpha$ .....	66
Tabel 5.2	Hasil Uji Kruskal Wallis Ekspresi ER $\alpha$ .....	67
Tabel 5.3	Rata-rata Ketebalan Endometrium .....	68
Tabel 5.4	Hasil Uji Kruskal Wallis Ketebalan Endometrium .....	69
Tabel 5.5	Hasil Analisa Korelasi Rank Spearman EVOO dengan Ekspresi ER $\alpha$ .....	71
Tabel 5.6	Hasil Analisa Korelasi Rank Spearman EVOO dengan Ekspresi ER $\alpha$ .....	72
Tabel 5.7	Ringkasan Uji Linier Sederhana .....	73
Tabel 5.8	Ringkasan Uji Linier Sederhana .....	74



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Sumber Pembentukan Radikal Bebas..... 6

Gambar 2.2 Tanaman *Olea europaea*..... 16

Gambar 2.3 Biosintesis dan Metabolisme Estrogen ..... 25

Gambar 2.4 Perbandingan Struktur Domain dari ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  ..... 28

Gambar 2.5 Fase Proliferasi ..... 32

Gambar 2.6 Fase Sekretorik ..... 34

Gambar 2.7 Fase Menstruasi ..... 35

Gambar 2.8 Kerangka Teori Penelitian ..... 43

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... 44

Gambar 4.1 Rancangan Penelitian..... 48

Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian..... 53

Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Mikroskop Ekspresi ER  $\alpha$ ..... 63

Gambar 5.2 Hasil Pengamatan Mikroskop Ketebalan Endometrium... 64

Gambar 5.3 Rata-rata Angka Ekspresi ER  $\alpha$ ..... 66

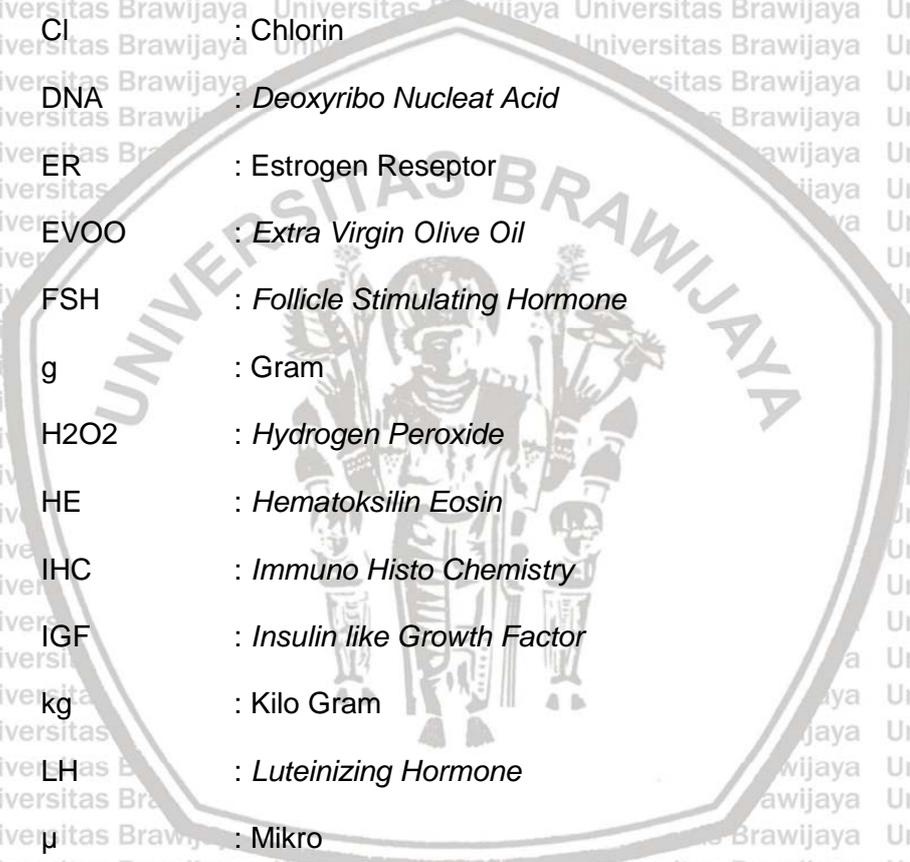
Gambar 5.4 Rata-rata Angka Ketebalan Endometrium..... 68

Gambar 5.5 Pengaruh EVOO terhadap Ekspresi ER  $\alpha$ ..... 73

Gambar 5.6 Pengaruh EVOO terhadap Ketebalan Endometrium..... 74

**DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL**

- $\alpha$  : Alpha
- $\beta$  : Beta
- BB : Berat Badan
- Cl : Chlorin
- DNA : *Deoxyribo Nucleat Acid*
- ER : Estrogen Reseptor
- EVOO : *Extra Virgin Olive Oil*
- FSH : *Follicle Stimulating Hormone*
- g : Gram
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : *Hydrogen Peroxide*
- HE : *Hematoksilin Eosin*
- IHC : *Immuno Histo Chemistry*
- IGF : *Insulin like Growth Factor*
- kg : Kilo Gram
- LH : *Luteinizing Hormone*
- $\mu$  : Mikro
- $\mu$ m : Mikro Meter
- MDA : *Malondialdehid*
- MUFA : *Monosaturated Fatty Acid*
- m : Meter
- mm : Mili Meter
- ml : Mili Liter



OH<sup>•</sup> : Radikal Hidroksil

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Superoxide anion

PUFA : Polyunsaturated Fatty Acid

Ppm : Part Per Mlilon

ROOH : Organic Peroxides

ROS : Reactive Oxygen Spesies

RO<sub>2</sub> : Peroxyl Radicals

SOD : Superoxide Dismutase

UV : Ultra Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WHO : World Health Organization



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	91
Lampiran 2	Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....	92
Lampiran 3	Surat Keterangan Tanda Terima Manuskrip Jurnal.....	93
Lampiran 4	Surat Keterangan Laboratorium Patologi Anatomi.....	94
Lampiran 5	Data Hasil Pemeriksaan RE $\alpha$ dan Ketebalan Endometrium..	95
Lampiran 6	SPSS Hasil Analisa RE $\alpha$ dan Ketebalan Endometrium.....	96



Data Hasil Pemeriksaan RE  $\alpha$  dan Ketebalan Endometrium



## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Pangan adalah komoditi utama dalam pemenuhan kebutuhan hidup. Pangan dalam bentuk jajanan di Indonesia sangat beraneka ragam dan memiliki bentuk yang sesuai dengan khas daerah tersebut. Salah satu tambahan dalam pangan adalah zat pewarna. Warna menarik biasanya menjadi prioritas utama dalam produksi makanan (Mukono, 2005). Tujuan penggunaan zat perwana dalam pangan antara lain adalah untuk membuat pangan menjadi lebih menarik, menyeragamkan warna pangan dan mengembalikan warna dari bahan dasar yang hilang atau berubah selama pengolahan. Namun disayangkan banyak pangan yang diproduksi berupa jajanan yang diberi zat pewarna yang bukan zat pewarna alami yang diperoleh dari pigmentasi tanaman, akan tetapi zat pewarna sintetis yang dilarang yaitu rhodamin B (BPOM, 2012).

Rhodamin B banyak digunakan sebagai tambahan zat pewarna karena harganya yang murah, mudah didapatkan di pasaran dan tampilannya pun lebih cerah dan terlihat lebih menarik (Muchtadi, 2012). Pada beberapa analisa jajanan pasar di Surakarta menunjukkan bahwa dari 41 jenis jajanan yang dipasarkan di 6 kecamatan terdapat 57% sampel positif yang mengandung rhodamin B (Utami dan Suhendi, 2009).

Menurut WHO, rhodamin B berbahaya bagi kesehatan manusia karena mengandung senyawa klorin (Cl). Senyawa klorin merupakan senyawa halogen yang berbahaya dan reaktif. Jika tertelan, maka senyawa ini akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara mengikat senyawa lain dalam tubuh, hal inilah yang bersifat racun bagi tubuh. Selain

itu, rhodamin B juga memiliki senyawa pengalkilasi (CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>) yang bersifat radikal sehingga dapat berikatan dengan protein, lemak, dan DNA dalam tubuh (BPOM, 2005). Berdasarkan reagen pewarnaan, rhodamin B memiliki struktur seperti quinone. Quinone adalah molekul aktif yang sangat redoks (reduksi oksidasi) yang dapat menyebabkan terbentuknya ROS sehingga menimbulkan stres oksidatif (Madeo *et al.*, 2013).

Paparan rhodamin B pada mencit dengan dosis 600 ppm secara oral selama dua siklus estrus, berpengaruh signifikan dapat memperlambat panjang siklus estrus pada mencit betina dewasa. (Febrina *et al.*, 2013).

Siklus kesuburan wanita sangat di pengaruhi oleh hormon LH (*Luteinizing Hormone*) dan FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) yang dihasilkan oleh hipofisis anterior. Hormon FSH merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium dan folikel yang sedang tumbuh ini mensekresikan hormon estrogen, pada saat terjadinya lonjakan dari hormon estrogen, hipofisis anterior akan meningkatkan sekresi hormon LH sehingga akan terjadi ovulasi. Setelah ovulasi LH akan merangsang jaringan folikel yang tertinggal di ovarium, untuk membentuk korpus luteum yang akan mensekresikan hormon progesteron. Hormon progesteron ini akan merangsang penebalan dinding endometrium untuk mempersiapkan kehamilan jika terjadi pembuahan (Ganong, 1998).

Hormon estrogen dibentuk oleh sel granulosa pada fase folikuler (Guyton dan Hall, 2016). Ukuran dan jumlah sel pada miometrium dan endometrium meningkat karena adanya stimulasi estrogen, disertai dengan tahapan pembentukan reseptor estrogen yang spesifik dan proses sintesa protein (Mylonas *et al.*, 2005). Pengaruh dari hormon estrogen menstimulasi sel epitel dan stroma endometrium berproliferasi serta meningkatkan ketebalan endometrium. Hormon estrogen yang masuk dalam sel target

kemudian berikatan dengan reseptor estrogen yang berada pada nukleus sehingga reseptor estrogen menjadi aktif (McDonnel dan Norris, 2002).

Terdapat dua reseptor estrogen yaitu reseptor estrogen  $\alpha$  dan reseptor estrogen  $\beta$ . Kedua reseptor ini dapat ditemukan pada endometrium, tetapi reseptor estrogen  $\alpha$  merupakan mediator utama dari aksi estrogenik pada jaringan endometrium (Bulun *et al.*, 2010). Reseptor estrogen  $\alpha$  lebih banyak ditemukan endometrium, payudara, stroma ovarium dan jaringan hipotalamus, sedangkan reseptor estrogen  $\beta$  lebih banyak ditemukan pada mukosa intestinal, paru, sumsum tulang, parenchyma, tulang, otak, sel endotel dan kelenjar prostat (Gruber *et al.*, 2002)

Paparan rhodamin B pada *Rattus norvegicus* berpengaruh pada hipotalamus, ovarium dan endometrium (Sulistina, 2013). Rhodamin B juga menurunkan kadar  $17\beta$  Estradiol dan ketebalan endometrium (Maryanti *et al.*, 2014) sehingga diperlukan antioksidan yang merupakan molekul yang bisa memperlambat atau mencegah kerusakan akibat dari oksidasi dari molekul lain seperti radikal bebas (Heim *et al.*, 2002)

*Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mengandung asam oleat, asam monosaturated (56% -83%), asam palmitat (8% -20%) dan asam linoleat (4% -20%) (Katan *et al.*, 1995). *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) diperoleh secara eksklusif melalui prosedur fisik, lebih dari sekedar lemak tak jenuh tunggal karena mengandung antioksidan dalam jumlah yang tinggi, terutama senyawa fenolik dan vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) (Fito *et al.*, 2007). Hasil penelitian dari Salem (2015), bahwa *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mengandung Omega-3, omega-6, MUFA yang memiliki kemampuan kuat untuk meningkatkan fungsi hormonal dengan merangsang hipotalamus sehingga dapat meningkatkan fertilitas pada tikus. Oleh karena itu penelitian lebih lanjut dilakukan untuk mengetahui pengaruh *Extra Virgin Olive Oil*

(EVOO) terhadap ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar oleh rhodamin B.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada pengaruh pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
2. Membuktikan *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
3. Membuktikan hubungan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
4. Membuktikan hubungan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

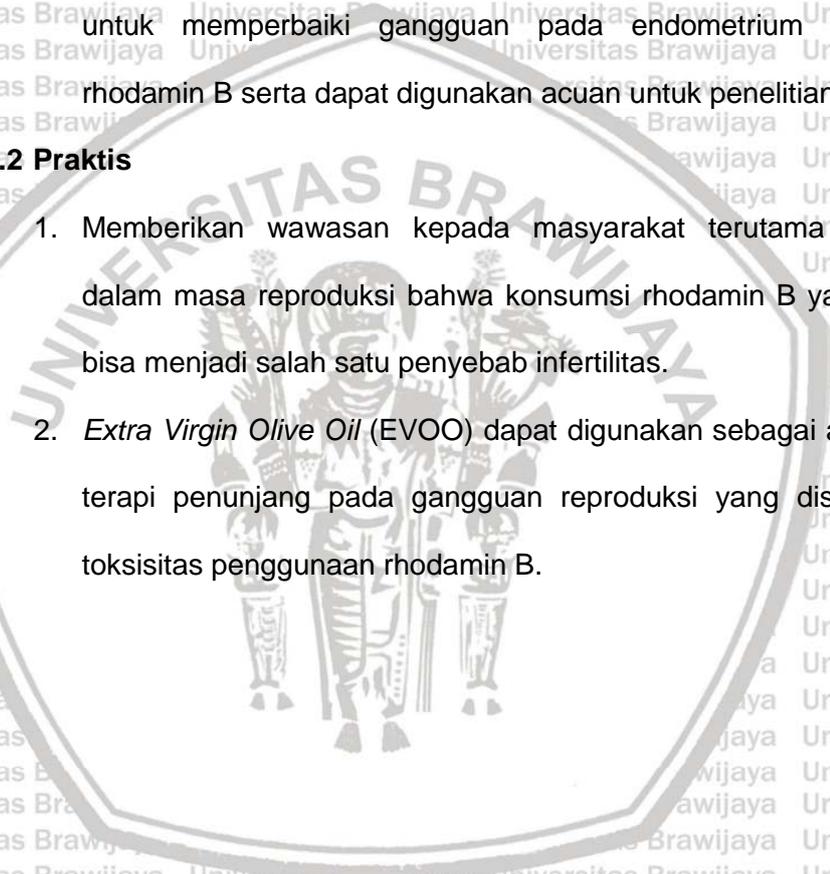
1. Memperluas wawasan tentang peran rhodamin B sebagai pemicu terjadinya stres oksidatif pada organ reproduksi sehingga menyebabkan perubahan pada endometrium terutama ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium.

2. Membuktikan pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) sebagai terapi untuk memperbaiki gangguan pada endometrium yang dipapar rhodamin B serta dapat digunakan acuan untuk penelitian selanjutnya.

### 1.4.2 Praktis

1. Memberikan wawasan kepada masyarakat terutama pada wanita dalam masa reproduksi bahwa konsumsi rhodamin B yang berlebihan bisa menjadi salah satu penyebab infertilitas.

2. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dapat digunakan sebagai alternatif untuk terapi penunjang pada gangguan reproduksi yang disebabkan oleh toksisitas penggunaan rhodamin B.



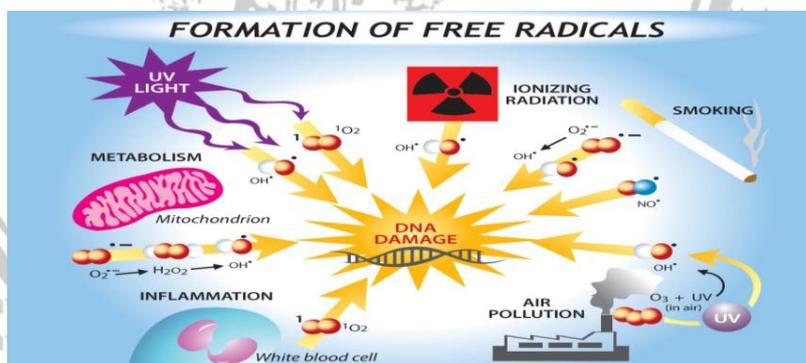
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas dan Stres Oksidatif

2.1.1 Definisi Radikal Bebas, ROS dan Stres Oksidatif

Radikal bebas merupakan senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya (Muchtadi, 2012). Sebagian elektron tubuh mempunyai elektron berpasangan (Danusanto, 2003). Dengan adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif dalam mencari pasangannya, caranya yaitu dengan menyerang atau dengan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom ( $R \cdot$ ). *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) termasuk karbohidrat, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta protein merupakan target utama radikal bebas. Dari unsur-unsur tersebut, asam lemak tak jenuh adalah yang paling rentan. (Winarsi, 2007).



Gambar 2.1 Sumber pembentukan radikal bebas

Keterangan: Pada pembentukan radikal bebas terdapat dua sumber penting yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal termasuk metabolisme sel normal misalnya mitokondria, retikulo endoplasma oksidasi serta beberapa aktivitas enzimatik. Sedangkan faktor eksternal seperti radiasi, oksidasi mesin knalpot, karbon tetraklorida, asap rokok dan polusi udara. ROS dapat menyebabkan kerusakan yang serius yaitu kerusakan protein, lipid peroksidase (Rajendran, 2013).

Berdasarkan gambar 2.1 dapat dilihat bahwa sumber radikal bebas berasal dari endogen dan eksogen (Rajendran, 2013). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal rantai respirasi yang terjadi dalam proses autoksidasi, fagositosis dalam respirasi, oksidasi enzimatis dan transport elektron pada mitokondria (Agarwal *et al.*, 2012). Sinar UV, radiasi, zat-zat polutan, aktivitas lingkungan, ozon, asap rokok, pestisida merupakan radikal bebas eksogen yang berasal dari luar sistem tubuh (Agarwal *et al.*, 2012).

Sebagian bisa dipicu melalui makanan dan minuman serta injeksi atau absorpsi melalui kulit (Muchtadi, 2013).

ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah salah satu bentuk senyawa atau molekul oksigen reaktif yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Senyawa menjadi sangat reaktif mencari pasangan karena adanya elektron yang tidak berpasangan tersebut. Dengan kecepatannya menarik dan menyerang elektron di sekelilingnya, reaktivitas radikal bebas menjadi sangat tinggi. Jika elektron terikat senyawa radikal bebas yang berasal dari senyawa yang berikatan kovalen maka menjadi sangat berbahaya karena ikatan digunakan bersama-sama pada orbital terluar. Reaktivitas berupa terbentuknya senyawa radikal baru yang membentuk reaksi berantai dan akan berhenti jika reaksinya direndam oleh senyawa yang bersifat antioksidan. ROS terdiri dari kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas yaitu *hydroxyl radicals* ( $\text{OH}^\cdot$ ), *superoxide anion* ( $\text{O}_2^\cdot$ ), *peroxyl radicals* ( $\text{RO}_2^\cdot$ ).

Sedangkan non radikal yaitu *hydrogen peroxide* ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), *organic peroxides* ( $\text{ROOH}$ ). Proses metabolisme oksidatif dalam tubuh menghasilkan senyawa oksigen reaktif misalnya dalam proses oksidasi makanan menjadi energi. ROS yang paling penting secara biologis dan yang paling banyak berpengaruh ke

system reproduksi yaitu *superoxide anion* ( $O_2^{\cdot-}$ ), *hydroxyl radicals* ( $OH^{\cdot}$ ), *peroxyl radicals* ( $RO_2$ ), *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ) (Muchtadi, 2013).

Stres Oksidatif adalah ketidakseimbangan antara radikal bebas, ROS dan antioksidan. Bisa disebabkan karena konsumsi pangan yang kurang mengandung antioksidan akibat meningkatnya produksi radikal bebas dan ROS yang penyebabnya adalah toksin dari makanan dan lingkungan serta ketidakcukupan fagosit pada kondisi inflamasi kronis misalnya (Muchtadi, 2013).

### 2.1.2 Peran Fisiologis ROS pada Organ Reproduksi

Dalam saluran reproduksi, ROS memiliki peran fisiologis dan patologis.

Secara fisiologis, ROS memodulasi fungsi reproduksi yaitu fungsi tuba, folikulogenesis, pematangan oosit, perubahan siklus endometrium. Pada fase meiosis I, peningkatan ROS dan penurunan antioksidan menstimulasi pertumbuhan oosit. Sedangkan pada fase meiosis II perkembangan folikel dipengaruhi oleh antioksidan. Sehingga dari hal ini terlihat adanya hubungan yang kompleks antara ROS dan antioksidan pada ovarium. Peningkatan sitokrom P450 memicu pembentukan ROS, sebagai akibat adanya peningkatan produksi steroid dalam folikel. Jadi ROS yang dihasilkan saat praovulasi menjadi faktor pemicu terjadinya ovulasi. Kekurangan oksigen merangsang angiogenesis folikular untuk tumbuh kembang folikel, sedangkan folikular ROS meningkatkan apoptosis. Untuk mengimbangi kedua mekanisme ini diperlukan GSH dan FSH.

Lonjakan estrogen menyebabkan peningkatan FSH sehingga terjadi produksi katalase pada folikel yang mencegah apoptosis. Lonjakan LH menyebabkan ovulasi. ROS dihasilkan pada saat LH surge pada reaksi inflamasi (Devine *et al.*, 2012).

Produksi oosit dimodulasi oleh interaksi kompleks endokrin, parakrin dan autokrin sehingga terjadi pematangan folikel, pematangan granulosa sel,

luteinisasi dan ovulasi. *Nitrit oxide* adalah faktor lokal yang terlibat dalam modulasi parakrin dan autokrin dari folikulogenesis dan steroidogenesis. Peran dari *nitrit oxide* ini ditentukan oleh *nitrit oxide sintase*, dimana ekspresinya diidentifikasi pada sel endotel vaskuler dan sel epitel permukaan kelenjar pada endometrium. Fungsi *nitrit oxide* ini mengatur microvasculer endometrium yang berperan penting pada fenomena menstruasi. Ekspresi *nitrit oxide sintase* dideteksi pada fase awal sekresi dan mencapai puncak pada pertengahan siklus (Agarwal *et al.*, 2006).

Pada fase sekresi lambat, terjadi perubahan konsentrasi SOD dan ROS pada endometrium. Perubahan yang terjadi meliputi peningkatan lipid peroksidase dan penurunan konsentrasi SOD. Kontribusi ROS pada peningkatan prostaglandin F2 *alpha*. Penurunan estrogen dan progesteron membuat aktifitas SOD menurun dan peningkatan konsentrasi ROS. ROS mengaktifkan NF-KB yang menekan ekspresi enzim siklooksigenase 2 dan meningkatkan produksi prostaglandin F2 *alpha* yang berperan dalam siklus endometrium (Agarwal dan Allamaneni, 2004).

### 2.1.3 Peran Patologis ROS pada Organ Reproduksi dan Infertilitas

Stres oksidatif pada organ reproduksi mengakibatkan terhambatnya pematangan oosit dan adanya gangguan fungsi reproduksi. Faktor berat badan serta faktor gaya hidup seperti konsumsi alkohol, merokok, obat-obatan serta paparan polutan lingkungan terbukti meningkatkan produksi radikal bebas.

Faktor peningkatan penyebab peningkatan ROS menginduksi peroksidasi lemak dengan merusak jaringan, DNA, mutagenesis dan mempromosikan kematian sel pada sistem reproduksi pria dan wanita yang mengakibatkan *infertilitas* atau kegagalan kehamilan (Ruder *et al.*, 2008).

Menurut Hochschild *et al.*, (2009) *Infertilitas* adalah tidak adanya konsepsi dalam satu tahun hubungan seksual tanpa kontrasepsi. Faktor yang mempengaruhi fertilitas meliputi faktor gaya hidup dan paparan lingkungan misalnya obesitas, merokok, marijuana, alcohol, polusi lingkungan, logam berat dll. Penyebab yang terbanyak antara lain:

1. Kelainan pada tuba dan peritoneum (30-40%). Pembentukan jaringan parut karena inflamasi pada penyakit radang panggul, abortus septik ruptur apendik, pembedahan pada tuba dan kehamilan ektopik menyebabkan adanya sumbatan pada tuba. Adanya endometriosis dan leiomyoma yang menjalar ke lumen tuba menyebabkan kelainan fungsi tuba.
2. Faktor laki-laki (30-40%) disebabkan adanya abnormalitas sperma yang merupakan akibat dari kelainan genetalia, pembedahan, trauma, disfungsi seksual, aktivitas fisik berat, dll.
3. Disfungsi ovulasi/ faktor ovarium (20-40%) merupakan kegagalan ovulasi pada setiap siklus menstruasi. Penyebabnya antara lain yaitu disfungsi hipotalamus, penyakit pada hipofisis, disfungsi endometrium yang menyebabkan rendahnya konsentrasi serum progesterone, sekresi LH yang tidak adekuat, defisiensi fase luteal.
4. Kelainan serviks dan uterus. Kelainan pada serviks disebabkan karena adanya abnormalitas interaksi sperma dan lendir serviks. Sedangkan kelainan pada uterus disebabkan adanya kelainan anatomi seperti kelainan kongenital, myoma uteri, polip endometrium, endometritis kronis sehingga menyebabkan gangguan fungsi uterus.

## 2.2 Rhodamin B

### 2.2.1 Zat Warna Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat pewarna yang dibuat secara sintetis. Rhodamin B berbentuk kristal hijau atau serbuk ungu kemerahan. Pada konsentrasi yang tinggi di air menghasilkan warna merah kebiruan sedangkan pada konsentrasi yang rendah menghasilkan warna merah terang atau berflourensi (Vidyasatya dan Cityca, 2011).

Rhodamin B merupakan bahan kimia yang digunakan sebagai pewarna dasar, memiliki rumus molekul (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl). Rhodamin B memiliki ikatan konjugasi menyebabkan rhodamin B berwarna merah. Menurut WHO, rhodamin B mempunyai senyawa pengalkilasi (CH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>) yang juga terkandung senyawa klorin (Cl) yang merupakan senyawa halogen berbahaya dan bersifat racun bagi tubuh (BPOM, 2012). Pemerintah menetapkan rhodamin B sebagai zat kimia yang berbahaya dan tidak boleh dipergunakan dalam industri pangan, hal ini diatur dalam perundang-undangan melalui Permenkes No.239/Menkes/Per/V/85 (Mukono, 2005).

### 2.2.2 Penggunaan Rhodamin B dalam Makanan

Rhodamin B seringkali disalahgunakan sebagai pewarna makanan misalnya pada pembuatan kerupuk, agar-agar, terasi, sosis, sirup, aromanis, kembang gula, manisan, cenil, cendol (BPOM, 2012), Rhodamin B juga ditemukan pada sambal kemasan, cendol, cenil, ikan asap, makaroni goreng (Vidyasatya, 2011). Masyarakat kurang mengerti mengenai zat pewarna yang aman untuk pangan, harga zat pewarna industri ini juga lebih murah dan warna yang dihasilkan lebih menarik (BPOM, 2012).

Zat warna sintetis ini adapat dicampurkan dan menghasilkan kisaran warna yang luas. Penelitian yang dilakukan pada pedagang cabe merah giling

menunjukkan bahwa dari 90 sampel, 63% mengandung rhodamin B (Djarismawati *et al.*, 2004). Survei yang dilakukan pada jajanan pasar di Surakarta juga ditemukan dari 41 sampel, 15 sampel mengandung rhodamin B. (Utami dan Suhendi, 2009).

Rhodamin B juga ditemukan dalam jajanan pasar di pasar tradisional kota Bandar Lampung yaitu dari 30 sampel 50% sampel dengan kadar cukup tinggi.

Jajanan tersebut antara lain kelanting, kerupuk, kembang gula, permen, kue, mutiara. Dan kadar tertinggi rhodamin B ditemukan pada sampel kerupuk (Permatasari *et al.*, 2014).

Ciri-ciri makanan yang mengandung rhodamin B yaitu warnanya yang yang cerah mengkilap, lebih mencolok. Terkadang terlihat warna yang tidak homogen dan terdapat gumpalan warna pada produk, yang bila dikonsumsi rasanya pahit dan terkadang muncul rasa gatal pada tenggorokan. Produk pangan yang mengandung rhodamin B biasanya tidak mencantumkan kode, merk, label, dan identitas lengkap lainnya (BPOM, 2012), apabila dikonsumsi warna makanan ini bisa menempel di kulit (Rahmawati, 2008).

### 2.2.3 Mekanisme Stress Oksidatif Yang disebabkan oleh Rhodamin B

Oksigen adalah sumber dari proses metabolisme dan respirasi pada organisme aerob. Oksigen bisa berimplikasi pada berbagai penyakit pada saat proses oksidasi yang dapat menimbulkan radikal bebas. Radikal bebas bisa terpicu oleh paparan lingkungan misalnya oleh polusi, *ultraviolet*, konsumsi bahan tambahan makanan, dll. Terdapat berbagai jenis zat yang diidentifikasi sebagai polutan lingkungan seperti bahan tambahan makanan yaitu pemanis buatan, pewarna, pengemulsi, pengawet, dll. Salah satu zat yang yang dilarang yaitu rhodamin B, penggunaannya dilarang oleh Badan POM, karena sifatnya yang toksik. Bahan kimia yang yang berpotensi menimbulkan toksisitas adalah

golongan *xenobiotic* (Mukono, 2005). *Xenobiotic* merupakan senyawa kimia yang tidak dibutuhkan oleh tubuh makhluk hidup yakni meliputi bahan kimia industri, bahan pengawet, pewarna, penyedap rasa, pestisida, obat-obatan, pencemaran lingkungan (Dewi, 2012).

Melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan dan kontak kulit, *xenobiotic* masuk ke dalam tubuh. Bahan *xenobiotic* bisa sampai pada organ dan jaringan perifer karena dalam tubuh manusia darah beredar ke seluruh tubuh dan organ. Bersifat *lipofilik* dan sangat berpengaruh pada jaringan tubuh yang mengandung banyak lemak misalnya jaringan syaraf dan otak. Mudah diabsorpsi, tetapi sulit untuk diekskresi (Mukono, 2005).

Bahan *xenobiotic* masuk ke dalam tubuh melalui proses absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi. Absorpsi rhodamin B terjadi di saluran pencernaan yang masuk ke lambung selanjutnya disalurkan ke *intestine* untuk diserap. Rhodamin B yang merupakan zat yang bersifat toksik menyebabkan terjadinya stres oksidatif sehingga berperan penting dalam patogenesis subfertilitas pada laki-laki dan perempuan (Mukono, 2005).

Enzim sitokrom P450 dependen oksidase mempunyai peran dalam biotransformasi dan detoksifikasi senyawa intermediate *xenobiotic* dan metabolik. Metabolisme tersebut menghasilkan senyawa peroksida atau senyawa oksigen reaktif, sebenarnya hidrogen peroksida tidak berbahaya dalam kondisi normal tetapi dapat membentuk radikal hidroksil yang sangat berbahaya dan berakibat pada kerusakan struktur sel jika berikatan dengan logam (Winarsi, 2007).

#### 2.2.4 Pengaruh Rhodamin B pada Organ Reproduksi

Paparan Rhodamin B pada *Rattus norvegicus* dengan dosis 4,5 mg, 9 mg dan 18 mg per oral dengan paparan selama 36 hari, berpengaruh pada hipotalamus, ovarium dan endometrium. Pada dosis 18 mg dapat meningkatkan

ekspresi BAX (proapoptosis) serta menurunkan ekspresi BCL-2 pada jaringan hipotalamus serta menurunkan kadar LH (Sulistina, 2013). Rhodamin B juga menurunkan kadar  $17\beta$  Estradiol dan ketebalan endometrium (Maryanti *et al.*, 2014). Paparan rhodamin B secara oral pada mencit pada dosis 150 ppm, 300 ppm dan 600 ppm selama dua siklus estrus, pengaruhnya signifikan memperlambat panjang siklus estrus pada mencit betina dewasa (Febrina *et al.*, 2013).

Dari pemeriksaan histologis ovarium, terlihat penurunan secara signifikan folikel pre antral dan antral yang diikuti berkurangnya jumlah folikel de graff serta korpus luteum bersamaan dengan peningkatan jumlah folikel atresia, selanjutnya diikuti oleh degenerasi endometrium, myometrium, lapisan epitel yang ditandai dengan penurunan ketebalan lapisan endometrium. Degenerasi endometrium terjadi karena adanya peningkatan produksi ROS misalnya hydrogen peroksida, radical superoksida dan radikal hidroksil (Chattopadhyay *et al.*, 2003).

### 2.2.5 Efek Rhodamin B pada Hipotalamus

Hipotalamus sensitif terhadap rhodamin B karena mampu menembus ke dalam sel dan terakumulasi dalam mitokondria kemudian mengganggu reaksi berantai pernapasan. Mitokondria memainkan peran penting dalam jalur seluler seperti metabolisme sel energi, regulasi apoptosis, redoks sel sinyal, serta produksi spesies oksigen reaktif. Kebocoran dari rantai pernapasan mitokondria dapat meningkatkan tingkat spesies oksigen reaktif kemudian menghidupkan jalur apoptosis. Jalur mitokondria sudah sering terlibat dalam apoptosis neuronal, bersama dengan protein Bax pro-apoptosis, komponen utama dari jalur ini. Selain itu, dikompromikan integritas membran mitokondria meliputi penataan proapoptotik Bax dan antiapoptotik Bcl-2 molekul dalam membran. Bax adalah

protein yang larut terutama di sitosol, dimana selama induksi apoptosis, Bax bergeser ke mitokondria membrane Bcl-2 hadir dalam mitokondria dan berfungsi sebagai penekan apoptosis. Rhodamin B dengan dosis 18 mg signifikan menurunkan kadar Bcl-2 (Sulistina, 2014).

Rhodamin B masuk ke dalam tubuh secara oral kemudian diabsorpsi di usus, setelah melewati usus/ lambung kemudian masuk ke aliran darah.

Selanjutnya ke liver untuk dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 dan menghasilkan senyawa peroksida, hydrogen peroksida, radikal hidroksil.

kemudian menuju system saraf pusat/ hipotalamus. Rhodamin B meningkatkan BAX (proapoptosis) dan menurunkan ekspresi BCL-2 (protein antiapoptosis).

Kondisi ini memodulasi terjadinya insufisiensi di hipotalamus, sehingga menyebabkan penurunan sekresi GnRH dan mempengaruhi hipofisis anterior dalam mensekresi hormone gonadotropin yang berperan pada proses steroidogenesis dan folikulogenesis (Sulistina, 2013).

## 2.3 *Extra Virgin Olive Oil*

### 2.3.1 *Tanaman Zaitun (Olea europaea)*

Buah Zaitun memiliki nama ilmiah *olea europaea* yang tergolong dalam famili *oleaceae*. Pohon zaitun merupakan perdu tahunan yang abadi dan menghasilkan buah pada saat usia lima tahun. Pohon zaitun mampu bertahan hidup ratusan bahkan ribuan tahun sehingga tanaman perdu ini bisa menjadi pohon yang besar. Pohon zaitun mampu memproduksi buah secara penuh pada usia 15-20 tahun. Zaitun muda yang berwarna hijau kekuningan biasa digunakan sebagai bumbu penyedap oleh masyarakat mediterania. Sedangkan buah zaitun matang berwarna ungu kehitaman yang biasanya diekstrak dan diambil minyaknya yang disebut sebagai minyak zaitun. Minyak zaitun selain digunakan untuk penambah

cita rasa makanan, juga memiliki beberapa manfaat baik untuk kesehatan maupun untuk kecantikan (Orey, 2008).

### 2.3.2 Taksonomi Tanaman Zaitun (*Olea europaea*)

Kingdom : *Green Plants*

Subkingdom : *Tracheobionat-vascular plants*

Superdivisi : *Spermatophyta-seed plants*

Divisi : *Magnoliophyta-flowering plants*

Kelas : *Magnoliopsida-Dicotyledons*

Subkelas : *Asteridae*

Famili : *Oleaceae-ash*

Genus : *Olea*

Spesies : *europaea*

(Johnson, 2005)



**Gambar 2.2** Tanaman *Olea europaea*

Keterangan: Tanaman *Olea Europaea* memiliki bunga kecil berwarna krem atau putih. Buahnya kecil berwarna hijau muda, berubah warna menjadi ungu gelap saat buah sudah matang (Fehri et al., 1996)

### 2.3.3 Morfologi Tanaman Zaitun (*Olea europaea*)

*Olea europaea* adalah pohon yang mempunyai ketinggian 3-15 m.

Batangnya mempunyai *cambium* dan *xylem*, bisa memiliki serat ataupun tidak.

Batang kayu parenkim terkadang paratrakeal ataupun protrakeal (Johnson, 2005).

Bunga kecil yang warnanya krem atau putih, dengan panjang 6-10 mm.

Buahnya kecil berwarna hijau muda dan terdapat bercak putih, yang bisa berubah warna menjadi ungu gelap saat buah sudah matang, diameternya 10 mm dan berbentuk tajam (Fehri *et al.*, 1996).

Daun tunggal dan berbentuk elips. Permukaan atas licin berwarna hijau keabu-abuan, permukaan bawah berwarna kuning keemasan. Panjang daun adalah 20-90 mm x 7-15 mm, ujungnya runcing dan tepinya rata (Fehri *et al.*, 1996).

#### 2.3.4 Unsur-unsur dalam *Extra Virgin Olive Oil*

Di bawah ini adalah beberapa unsur gizi dalam *Extra Virgin Olive Oil*:

- a. Vitamin E yang merupakan antioksidan, memperkuat daya tahan tubuh, mengurangi resiko penyakit jantung dan beberapa bentuk kanker
- b. Asam Lemak Esensial merupakan lemak yang baik bagi kesehatan, seperti omega-3 dan omega-6 yang dapat menangkal penyakit jantung, obesitas dan diabetes.
- c. Klorofil memiliki sifat antioksidan
- d. Senyawa fenol bertindak sebagai antioksidan
- e. Fitoestrogen membantu mencegah keropos tulang, meminimalkan gejala menopause yang mengganggu.
- f. Sterol menangkal penyerapan kolesterol dalam makanan oleh usus

*Extra Virgin Olive Oil* mengandung polifenol yaitu senyawa alami yang bekerja sebagai antioksidan kuat (enzim penentang penyakit yang melindungi tubuh dengan cara menangkap molekul-molekul radikal bebas dan menyingkirkannya sebelum menimbulkan kerusakan). Minyak zaitun dibuat dari varietas zaitun yang biasa dipakai berkebun misalnya zaitun hitam atau hijau.

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yaitu mempunyai banyak gugus fenol dalam molekulnya.

Polifenol berperan sebagai pemberi warna pada suatu tumbuhan seperti warna daun pada musim gugur. Pada beberapa penelitian disebutkan bahwa kelompok polifenol memiliki peran sebagai antioksidan yang baik untuk kesehatan.

Polifenol dapat ditemukan pada kacang-kacangan, teh hijau, teh putih, anggur merah, anggur putih, minyak zaitun dan turunannya, cokelat hitam dan delima (Orey, 2000).

Kandungan minyak zaitun menurut Kinanthi (2009) adalah sebagai berikut:

a. Sumber Squalene

Kandungan senyawa minyak zaitun seperti fenol, tokoferol, pigmen, sterol dan squalene serta triasilgliserol yang sebagian berupa asam lemak tak jenuh tunggal jenis asam oleat. Kandungannya 55-83 % dari total asam lemak. Konsentrasi squalene minyak zaitun tertinggi dibandingkan dengan jenis minyak yang lain. Squalene merupakan zat organik yang berupa cairan encer tetapi bukan minyak karena tidak mengandung asam lemak atau gugusan karboksil. Secara alamiah squalene terdapat dalam tubuh dan tersebar pada semua organ dan jaringan.

b. Kaya Antioksidan

Salah satu komponen minyak zaitun yang penting yaitu tokoferol (vitamin E) yang terdiri dari tokoferol alfa, beta, gama dan delta. Konsentrasi tertinggi terdapat pada jenis alfa yang hampir mencapai 90 % dari total tokoferol. Oleh karena itu minyak zaitun sangat ideal untuk antioksidan.

Warna minyak zaitun yang murni disumbang oleh klorofil, karotenoid dan feofitin. Klorofil dan feofitin dapat melindungi minyak terhadap oksidasi

dalam kondisi gelap sedangkan karotenoid dapat melindungi dari oksidasi dalam kondisi terang. Ketiga pigmen tersebut mempermudah penyerapan minyak dalam tubuh. Dalam proses pemurnian minyak zaitun, menghasilkan komponen lain yang bermanfaat yaitu hidroksitirosol dan tirosol, dimana hidroksitirosol terbukti efektif meningkatkan aktivitas antioksidan dalam plasma serta melindungi terhadap oksidasi LDL.

c. Mencegah Obesitas dan Osteoporosis

Minyak zaitun dapat memecah sel adiposit penyebab dari obesitas sehingga direkomendasikan untuk menggantikan diet minyak lemak jenuh yang sering dikonsumsi. Minyak zaitun juga bermanfaat mengatasi osteoporosis. Uji yang dilakukan pada tikus menunjukkan pemberian minyak zaitun 50 gram per kgbb selama 3 bulan dapat memulihkan bobot tulang hingga 70-75%.

d. Efektif Melawan Kanker

Penggunaan minyak zaitun pada proses memasak daging dapat mereduksi HCA. Pada saat menggoreng atau memanggang sapi atau ayam terbentuk senyawa HCA yaitu penyebab mutasi yang dapat merangsang munculnya radikal bebas dan merusak DNA.

e. Meningkatkan Metabolisme

Mengonsumsi  $\frac{1}{2}$  cup dari buah zaitun setiap hari dapat mencegah kegemukan. Khasiat ini berasal dari lemak tak jenuh tunggal yang mempercepat pembakaran lemak serta mencegah gula diubah jadi lemak.

f. Merevitalisasi Sistem Imun

Zaitun yang kaya dengan vitamin E larut lemak, dapat melindungi sel-sel dari radikal bebas yang berbahaya. Antioksidan ini menguatkan sistem imun.

g. Meningkatkan Sirkulasi

Zaitun yang merupakan sumber istimewa dari polifenol, senyawa antioksidan yang berbahaya. Studi pada *Journal American College of Cardiology* mengaitkan senyawa ini dengan peningkatan kadar *nitric oxide*, molekul jantung sehat yang dapat meningkatkan pelebaran pembuluh darah dan aliran darah.

### 2.3.5 Seni Menghasilkan Minyak Zaitun

Pemetikan zaitun biasanya dilakukan antara pertengahan November dan pertengahan Januari. Zaitun dikumpulkan dalam jala yang ditempatkan di seputar kaki pohon. Dalam jangka 24 jam setelah pemetikan, zaitun diangkat langsung menuju kilang untuk diperas minyaknya.

Perasan terhadap buah zaitun yang utuh menghasilkan semacam pasta.

Biasanya dilakukan dengan bantuan batu giling granit atau baja yang bentuknya hampir tidak berubah sejak 1.000 tahun yang lalu. Selanjutnya pasta digelar di atas alas tipis, yang kemudian ditumpuk dan ditaruh dalam mesin peras. Mesin ini melakukan tekanan sebesar beberapa ratus pon dan pasta itu akan mengeluarkan minyak dan air yang merembes melalui alas tipis itu tadi, lalu menetes ke dalam tabung – tabung penampung. Proses ini tidak membutuhkan panas, dari sinilah munculnya istilah minyak zaitun yang “pertama diperas dingin”. Menurut kolumnis Ilmu Pangan Robert L. Wolke, professor emeritus kimia pangan di *University of Pittsburgh* dan penulis *Einstein Told His Cook: Kitchen Science Explained* (W.W. Norton & Company, 2005), perasan dingin

berarti zaitun dan mesin perasnya tidak dipanaskan atau dicelup ke dalam air panas. Suhu maksimum yang diperkenankan untuk *Extra Virgin Olive Oil* adalah 25°C atau 77°F. Panas bisa memberi hasil minyak lebih banyak ketika diperas tetapi dapat merusak kualitas dan rasa. Perasaan dingin ini adalah satu-satunya perasaan yang dilakukan. Zaitun nyaris tidak pernah diperas dua kali dengan tekanan yang lebih besar, hal ini hanya akan mengeluarkan cairan pahit dari biji.

Sisa minyak dalam buah dipancing keluar dengan air panas atau pelarut organik.

Minyak tersebut menghasilkan kualitas yang lebih rendah dan tidak dapat diberi label "*extra virgin*" (Orey, 2008).

Metode lain, seperti sentrifugasi kadang juga dipergunakan untuk memisahkan minyak dari zaitun. Tetapi alat peras mekanik adalah cara yang paling populer digunakan. Setelah diperas, minyak dibiarkan agar mengendap dan cairan buah dipisahkan menggunakan mesin sentrifuge. Ketika minyak zaitun telah siap, minyak itu dipisahkan agar nilai berdasarkan kualitasnya dan ditempatkan dalam golongannya.

### 2.3.6 Gradasi Kualitas Minyak Zaitun

- a. *Extra virgin* yaitu minyak yang dihasilkan dari zaitun berkualitas nomor satu. Hanya boleh memiliki kesamaan alami kurang dari 1%. Rasa buahnya kuat, dianjurkan untuk kesehatan dan dapat diminum secara langsung.
- b. *Virgin* yaitu minyak yang diproses secara mekanik (dengan perasan) tanpa panas, yang mengubah tingkat keasaman menjadi antara 1-5%
- c. *Pure* yaitu campuran dari minyak zaitun sulingan (diolah dengan uap dan bahan kimia), harganya lebih murah. Tingkat keasaman berkisar 3-4%
- d. *Extracted and refined* yaitu dibuat dari sisa perasan pertama, dengan menggunakan pelarut kimia.

e. *Pomace* yaitu dibuat dengan ekstraksi kimia dari residu yang tersisa setelah perasan dan pemrosesan kedua. Mengandung keasaman 5-10%

Pakar minyak zaitun dr.Deane membenarkan bahwa minyak yang *extra virgin* adalah salah satu jenis minyak yang dapat dikonsumsi dan dinikmati tanpa pengolahan kimiawi. Minyak zaitun yang diperas segar dapat dinikmati langsung dan masih memiliki seluruh kandungan alami, vitamin, mineral, antioksidan dan produk-produk kesehatan lain yang terkandung dalam buah zaitun matang (Orey, 2008).

### 2.3.7 *Extra Virgin Olive Oil* sebagai Antioksidan

ROS sering dikaitkan dengan stres oksidatif, suatu kondisi yang ditandai dengan ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan mekanisme antioksidan endogen. ROS mampu merusak makromolekul biologis secara reversibel atau ireversibel, seperti asam nukleat, protein, lipid dan karbohidrat.

Dengan demikian, stres oksidatif dapat menyebabkan berkembangnya sejumlah kondisi patologis, seperti kanker, diabetes, obesitas, neurodegeneratif dan penyakit autoimun. Pada organisme hidup, ada berbagai mekanisme defensif endogen melawan radikal bebas, termasuk antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Selain mekanisme endogen, organisme juga dapat memperoleh komponen antioksidan melalui diet. Polifenol, produk metabolisme sekunder pada tanaman, adalah beberapa antioksidan yang paling penting.

Seluruh sistem vaskular terdiri dari monolayer sel endotel. Integritas sel endotelial diperlukan untuk fungsi peredaran darah. Selain itu, endotelium mengatur respon homeostasis, kekebalan dan inflamasi. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada endotel vaskular karena hilangnya integritasnya, yang menyebabkan penuaan dan pelepasannya ke dalam sirkulasi. Dengan demikian, salah satu faktor yang paling penting dari kondisi patologis pembuluh

darah yaitu aterosklerosis dan trombosis. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada endotelium melalui terapi leukosit. Selain itu, interaksi antara ROS dan nitrat oksid memicu lingkaran setan yang menyebabkan aktivasi endotel dan pembengkakan lebih lanjut. Stres oksidatif juga terjadi pada jaringan otot. Secara khusus, konsumsi oksigen tingkat tinggi terjadi pada otot rangka yang dapat menyebabkan pengurangan oksigen yang tidak sempurna dan kebocoran elektron dari rantai transfer elektron, yang menyebabkan pembentukan ROS dan stres oksidatif. Induksi stres oksidatif melalui mekanisme *xanthine oxidase*. Stres oksidatif, pada gilirannya, menyebabkan kelelahan otot, kerusakan sel dan apoptosis (Kouka, 2017).

Sifat dari *Olea europaea* dan produk turunannya sudah dikenal sejak zaman kuno. Sifat nutrisi EVOO disediakan oleh profil asam lemaknya (FA) dan rasio FA monounsaturated/ jenuh yang tinggi (MUFA / SFA), dan juga kandungan antioksidannya yang kaya, terutama yang mengandung biofenol yang diyakini berperan dalam pencegahan penyakit. Biofenol EVOO bertindak sebagai pelarut rantai oksidasi, bereaksi dengan radikal bebas dan membentuk radikal tidak aktif. Beberapa biofenol yang paling penting ditemukan di EVOO dengan aktivitas biologis yang ditandai, adalah *oleocanthal* (OLEO), *oleacein* (OLEA), asam elenoat, oleuropein dan turunannya, *tirosolid* (T) dan *hydroxytyrosol* (HT). Senyawa ini memiliki kemampuan untuk mengais radikal bebas dengan menyumbangkan elektron atau atom hidrogen atau dengan logam pengkelat. Di antara biofenol EVOO, HT telah menarik perhatian yang berbeda karena aktivitas antioksidannya yang manjur terutama disebabkan oleh struktur ortodifenolnya. Hal ini terutama ditemukan pada daun pohon zaitun, bubur zaitun dan EVOO (Kouka, 2017).

Antioksidan adalah substansi atau molekul yang bisa memperlambat atau mencegah kerusakan akibat dari oksidasi molekul lain seperti radikal bebas.

Sebagai pencegahan dari dampak negatif antioksidan maka tubuh memerlukan antioksidan yang berfungsi mencegah terbentuknya stress oksidatif. Senyawa antioksidan alami tumbuhan pada umumnya adalah flavonoid. Diketahui bahwa

*Extra Virgin Olive Oil* memiliki tingkat kandungan flavonoid yang tinggi (Heim *et al.*, 2002). Cara kerja dari antioksidan ini yaitu membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas. *Extra Virgin Olive Oil* termasuk dalam golongan antioksidan non enzimatis yang bersifat preventif dengan merusak pembentukan oksigen yang reaktif (Devasagayam, 2004).

*Extra Virgin Olive Oil* memiliki kandungan polifenol yang tinggi. Polifenol dikenal sebagai anti inflamasi, antioksidan, antikoagulan. *Extra Virgin Olive Oil* juga mengandung antioksidan lainnya seperti senyawa fenolik, tokoferol, squalene, klorofil (pigmen warna) dan beta karoten. Dosis normal konsumsi EVOO per hari adalah 25-40 ml atau 8-70 gram. *Extra Virgin Olive Oil* dengan dosis oral 1 cc (1g/kgbb) dapat menurunkan kadar MDA pada tikus jantan (Meilina, 2017).

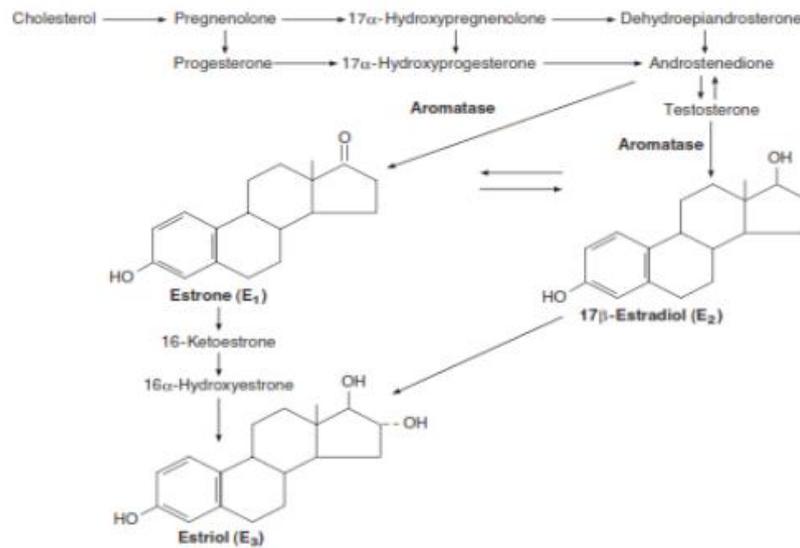
Dari penelitian Nugraheni (2012), menunjukkan bahwa pemberian minyak zaitun sebanyak 0,5 gram; 0,7 gram; dan 0,9 gram berpengaruh terhadap profil lipid pada tikus, dilihat dari perbandingan rerata kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kolesterol HDL dan trigliserida pada semua kelompok.

## 2.4 RESEPTOR ESTROGEN

### 2.4.1 Struktur Estrogen

Hormon estrogen adalah hormon steroid kelamin karena mempunyai struktur kimia yang berintikan steroid yang sebagian besar diproduksi oleh

kelenjar endokrin system reproduksi wanita. Fungsi utama hormon estrogen berhubungan dengan fungsi alat kelamin baik pada perempuan maupun pada laki-laki. (Guyton, 2007). Terdapat tiga estrogen yang penting yaitu 17 β estradiol (E2), Estron (E1) dan estriol (E3). Estradiol adalah yang paling utama secara biologis. Perbandingan biologis ketiga hormone tersebut yaitu E2 : E1 : E3 = 10 : 5 : 1 (Sperrof *et al.*, 2005).



**Gambar 2.3 Biosintesis dan Metabolisme Estrogen**

Keterangan: Kolesterol adalah substrat utama pembentuk estrogen. Kolesterol mengalami perubahan menjadi pregnenolon, progesterone, 17α hidroksi progesterone, dehydroepiandrosteron, androstenedion, testosterone. Androstenedion selanjutnya diubah menjadi estron, sedangkan testosterone diubah menjadi 17β estradiol. Estriol diproduksi dari 17β estradiol dan estron (Ganong, 2010).

Berdasarkan gambar 2.3 diketahui bahwa kolesterol merupakan substrat utama pembentuk estrogen. Kolesterol mengalami perubahan menjadi pregnenolon, progesterone, 17α hidroksi progesterone, dehydroepiandrosteron, androstenedion, testosterone. Androstenedion selanjutnya diubah menjadi estron, sedangkan testosterone diubah menjadi 17β estradiol. Estriol diproduksi dari 17β estradiol dan estron (Ganong, 2010). Estrogen adalah hormon yang

diproduksi di dalam sel granulosa folikel ovarium yang sedang tumbuh, pada palsenta dan pada korpus luteum. Estrogen diproduksi dan disekresikan oleh ovarium. Ovarium mensekresi Estron (E1) dalam jumlah yang banyak. Sedangkan estriol diproduksi dari estradiol dan estron di jaringan tepi serta dari androgen yang disekresi korteks ginjal dan sel teka ovarium.  $17\beta$  estradiol dianggap menjadi estrogen yang utama karena potensinya 12 kali lebih besar dari estron dan 80 kali lebih besar dari estriol. Meskipun begitu, efek estrogenic dari estron tidak bisa diabaikan (Guyton, 2007).

#### 2.4.2 Metabolisme Estrogen

Estrogen berpengaruh pada pertumbuhan, diferensiasi dan fungsi dari beberapa jaringan, yaitu jaringan system reproduksi, kelenjar susu, ovarium, uterus, testis dan prostat (Astuti, 2009).

Estrogen terbentuk melalui proses aromatisasi pada proses yang kompleks. Estron adalah estrogen utama dalam masa reproduksi. Asal dari estron adalah dari hasil metabolisme estradiol serta aromatisasi jaringan perifer yaitu lemak, hepar, otot skeletal, folikel yang mengubah danrostenedion menjadi estrogen (Gruber, 2002).

Dalam ovarium, produksi steroid terjadi pada sistem dua sel. Sel teka menghasilkan androgen yang kemudian androgen berdifusi ke dalam sel granulosa dan mengalami metabolisme oleh aromatase menjadi estrogen. Sel granulosa ini mempunyai banyak reseptor *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) yang menginduksi aktifitas aromaterase pada sel granulosa yang meningkatkan konversi androgen menjadi estrogen (Speroff dan Fritz, 2005).

#### 2.4.3 Reseptor Estrogen

Estrogen bisa berfungsi bila menempel pada reseptornya. Reseptor estrogen terdapat di dalam sel. Estradiol memiliki kemampuan yang lebih tinggi

untuk berikatan dengan reseptor dibanding estron dan estriol. Aktivitas estriol lebih rendah, karena ketika dikombinasikan dengan reseptor estrogen, bentuk konformasinya berubah (Sperrof dan Fritz, 2005).

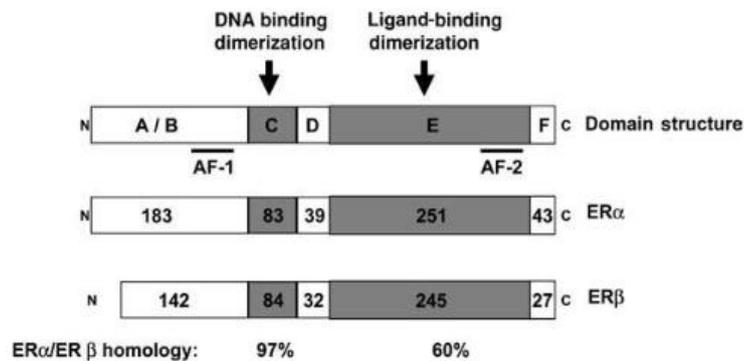
Tugas gen reseptor estrogen yaitu mengkode protein yang berfungsi sebagai reseptor estrogen, yakni ligan mengaktivasi faktor transkripsi beberapa domain penting sebagai tempat untuk berikatan dengan hormon. Protein yang dihasilkan kemudian terlokalisasi pada nucleus baik estrogen maupun reseptornya yang merupakan faktor penting dalam pertumbuhan dan fungsi dari organ reproduksi (Gruber *et al.*, 2012).

Untuk berikatan dengan reseptornya, estrogen harus menembus permukaan sel kemudian masuk ke dalam sitoplasma untuk berikatan dengan reseptor estrogen di sitoplasma dan membentuk ikatan hormon reseptor pada *Estrogen Responsive Element* yang selanjutnya bergerak menuju inti sel dan berikatan dengan DNA sehingga terjadi proses transkripsi untuk membentuk protein-protein khusus yang diperlukan dalam pembelahan sel (Speroff dan Fritz, 2005).

Karakteristik hormon yang mengikat ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  sama-sama menunjukkan bahwa keduanya memiliki respon yang sebanding pada hormon yang sama. Beberapa perbedaan diantara keduanya yaitu ER  $\beta$  mempunyai afinitas yang besar sebagai fitoestrogen dibanding ER  $\alpha$ . Gen pengkode keduanya juga berbeda, sehingga afinitas berbeda terutama pada bentuk konformasi dan konteks seluler. Karena domain pengatur keduanya berbeda maka ER  $\beta$  tidak mampu mengaktifkan transkripsi gen dengan cara TAF-1 (*Transcriptional Activation Function-1*). Domain DNA binding dari ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  memang sangat mirip tetapi secara keseluruhan homologi dari kedua reseptor ini rendah. (Speroff dan Fritz, 2005).

Sama halnya dengan reseptor hormon steroid lainnya, ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  mampu melakukan ekspresi gen jika teraktivasi. Reseptor estrogen terdapat pada pembuluh darah, uterus, ovarium, paru, tulang, vesika urinaria, otak. Reseptor tersebut memungkinkan terjadinya efek langsung pada pembuluh darah pada sel endotel maupun sel otot. ER  $\alpha$  banyak ditemukan di endometrium, payudara, jaringan hipotalamus, stroma ovarium, uterus, hati, ginjal, jantung. ER  $\beta$  ditemukan diovarium, mukosa intestinal, paru, tulang, sungsung tulang, system saraf pusat, system *hemopoetic, parenchyma*, sel endhotel dan kelenjar prostat (Gruber *et al.*, 2002).

ER  $\alpha$  terekspresi paling banyak pada organ reproduksi wanita. ER  $\alpha$  jauh lebih tinggi dibandingkan dengan ER  $\beta$  pada endometrium normal. Ekspresi kedua hormone tersebut, selama siklus menstruasi menurun pada fase sekresi akhir dibanding dengan fase proliferasi. Terjadi peningkatan progresif tebal endometrium pada fase folikuler. Pertumbuhan endometrium terjadi karena proliferasi epitel dan elemen stroma yang dipengaruhi oleh estradiol yang disekresi ovarium (Gruber *et al.*, 2002).



Gambar 2.4 Perbandingan Struktur Domain dari ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$

Keterangan: Reseptor estrogen adalah anggota dari superfamily nuclear reseptor dan berbagi struktur domain, digambarkan dengan skematis. Terdapat enam domain A-F yang memiliki asam amino dalam domain dan fungsi yang terkait dengan domain tersebut. AF 1 dan AF 2 merujuk ke daerah yang memediasi fungsi aktivasi transkripsi dari ER. Tingkat homolog antara ER  $\alpha$  dan ER  $\beta$  pada C sera domain estrogen yang ditunjukkan dibawah domain tersebut (Hewitt *et al.*, 2005).

Berdasarkan gambar 2.4 diketahui bahwa ER dibagi menjadi enam domain fungsional yaitu : yang pertama yaitu domain A/B terminal NH-2 yang secara mandiri dapat mengaktifkan transkripsi ligan. Domain C yang terdiri dari domain yang mengikat DNA dan mengandung empat sistein yang tersusun pada dua struktur pengikat zink. Domain D mengandung signal lokalisasi inti dan disebut juga sebagai daerah engsel. Selanjutnya domain E/F mempunyai berbagai macam fungsi yaitu dimerisasi, sebagai pengikatan ligan, transaktivasi bergantung ligan yang perantaranya yaitu domain AF-2.

## 2.5 ENDOMETRIUM

### 2.5.1 Morfologi Endometrium

Endometrium merupakan jaringan dinamik yang merespon hormone steroid yang beredar pada sepanjang siklus menstruasi yang normal (Guidice, 2006). Secara morfologi, salah satu yang paling dinamis dari jaringan target pada wanita adalah endometrium. Perubahan struktural siklik mencerminkan perubahan pada fungsi metabolisme dimana ovarium estradiol dan progesterone sebagai pengaturnya. Endometrium dianggap sebagai indikator yang paling sensitive dari sumbu hipotalamus-hipofisis-ovarium hormonal karena adanya interaksi, struktur, fungsi serta rangsangan hormone, sehingga morfologi endometrium digunakan sebagai evaluasi diagnostik kesuburan, sebagai penentuan apakah ovulasi terjadi.

Endometrium adalah organ yang sangat responsif terhadap perubahan hormon reproduksi, yaitu hormon estrogen yang peranannya penting untuk

proliferasi (Puspitadewi, 2007). Perubahan ukuran ketebalan endometrium adalah regulasi perubahan hormon estrogen. Gangguan pada implantasi zigot yang memperkecil kemungkinan terjadinya kehamilan disebabkan oleh ketebalan dinding endometrium yang berkurang. Semakin tipis endometrium maka memperkecil tingkat kehamilan yang hubungannya dengan fungsi ovarium dan endometrium (Putri, 2007).

Endometrium adalah membran tipis yang warnanya merah muda, membrannya menyerupai beludru, memiliki banyak lubang kecil yaitu ostia pada kelenjar uterus. Endometrium normal mempunyai ketebalan bervariasi, yaitu 0,5 mm – 5 mm, terdiri dari epitel permukaan, kelenjar, jaringan mesenchymal interglandular yang mempunyai banyak pembuluh darah (Cunningham *et al.*, 2005).

Permukaan endometrium terdiri atas satu lapisan epitel padat yang berbentuk kolumnar besar dan memiliki sel-sel bersilia. Kelenjar terbentang dengan luas dan memanjang di seluruh ketebalan endometrium sampai myometrium. Jaringan ikat endometrium antara epitel permukaan dan myometrium adalah stroma mesenchymal. Stroma bervariasi sepanjang siklus ovarium (Cunningham *et al.*, 2005).

Endometrium terbagi menjadi lapisan fungsionalis yang terletak pada dua pertiga atas dan lapisan basalis pada sepertiga bawah. Lapisan fungsionalis berfungsi mempersiapkan endometrium sebagai tempat implantasi blastosit sehingga menjadi tempat terjadinya proliferasi, sekresi dan degenerasi. Lapisan basalis berfungsi menyediakan endometrium regenerative setelah hilangnya lapisan fungsionalis pada saat menstruasi (Sperof dan Fritz, 2005).

Pada keadaan normal, endometrium menebal dengan kecepatan 0,5 mm/hr, pada hari -3 hingga +2 ovulasi, kemudian kecepatannya melambat 0,1

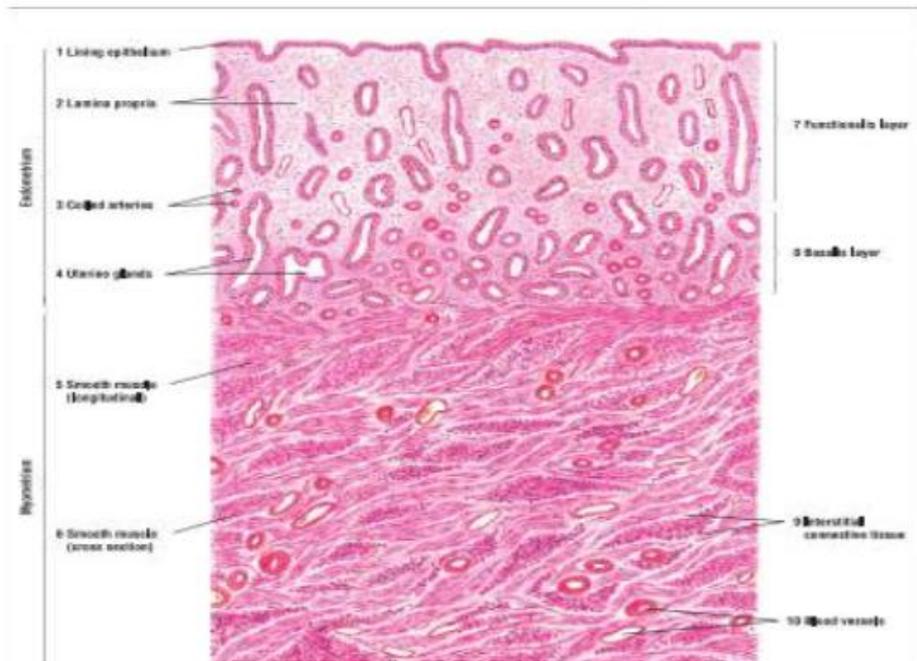
mm/hr selama fase luteal hingga hari + 11. Perubahan pada ketebalan endometrium juga terjadi pada pemakaian kontrasepsi, menopause, defek fase luteal, serta keadaan patologis uterus yang berakibat hiperplasia endometrium dan keganasan endometrium. Pada saat sebelum implantasi, endometrium harus sudah siap dan matang, yaitu dalam keadaan proliferasi dan diferensiasi seperti proliferasi vaskuler, sekresi kelenjar, edema, desidualis stroma (Erwinanto, 2004).

### 2.5.2 Siklus Endometrium

Pada masa haid, terdapat perubahan morfologi endometrium yang berkaitan dengan fungsi ovarium, terbagi dalam tiga fase yaitu:

#### 1. Fase Proliferasi (Folikular)

Endometrium pada fase ini dipengaruhi oleh estrogen ovarium. Terjadi peningkatan ketebalan stratum fungsionalis dan kelenjar rahim yang memanjang ke seluruh permukaan. Arteri spirala melingkar melintas pada bagian dalam endometrium. Pada daerah atas endometrium terdapat lamina propria yang merupakan sel dan menyerupai jaringan mesenchymal. Jaringan ikat lapisan basalis tampak lebih gelap dan lebih padat. Selama fase proliferasi ini endometrium terus berkembang karena tingginya estrogen yang disekresi oleh folikel yang berkembang pada ovarium (Cunningham *et al.*, 2005).



**Gambar 2.5 Fase Poliferasi**

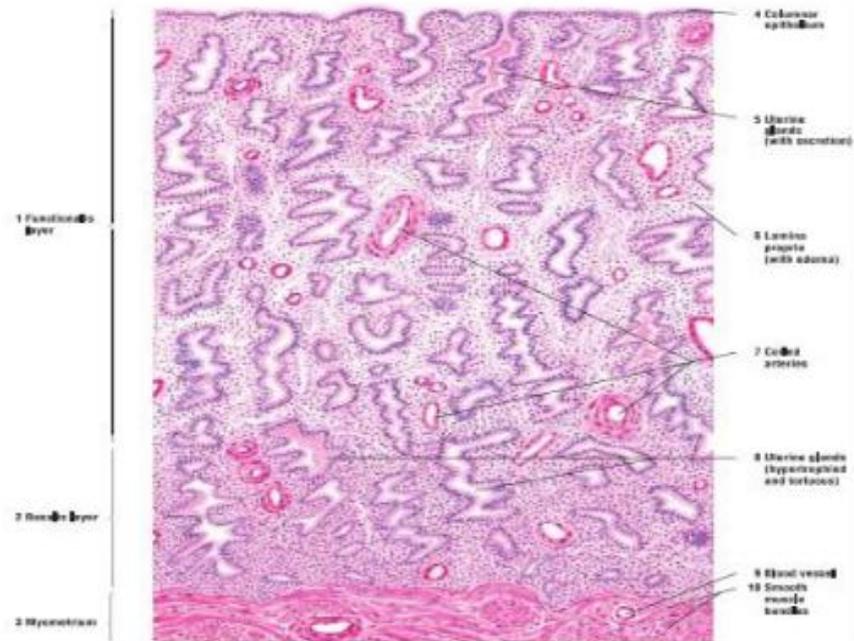
Keterangan: Endometrium terus berkembang sebagai akibat dari tingginya tingkat estrogen yang disekresikan oleh folikel ovarium berkembang (Eroschenko, 2012).

Berdasarkan gambar 2.5 terlihat bahwa permukaan endometrium dilapisi oleh epitel (1) kolumnar selapis di atas lamina propria (2) yang tebal. Epitel pelapis meluas turun ke dalam jaringan ikat lamina propria dan membentuk kelenjar uterus (4) yang tubular dan panjang. Pada fase proliferasi, kelenjar uterus biasanya lurus di bagian superfisial endometrium tetapi mungkin memperlihatkan percabangan di bagian-bagian myometrium yang lebih dalam. Karenanya, pada potong lintang, terlihat banyak kelenjar uterus. Dinding uterus terdiri dari tiga lapisan: endometrium dalam (1-4), lapisan tengah berupa otot polos myometrium (5,6) dan membrane serosa luar perimetrium (tidak diperlihatkan). Endometrium dibagi lagi menjadi dua zona atau lapisan: lapisan basal (8) yang dalam dan sempit di samping myometrium (5) dan lapisan fungsional (7) yang lebih lebar dan superfisial di atas lapisan basal dan terbentang ke lumen uterus. Selama daur haid, endometrium memperlihatkan

perubahan morfologik yang berkorelasi langsung dengan fungsi ovarium. Pada fase proliferasi dan di bawah pengaruh estrogen ovarium, stratum fungsional (7) menebal, dan kelenjar uterus memanjang serta berbentuk lurus ke arah permukaan. Arteri spiral (kumparan) (3) pada potong lintang terutama terlihat di bagian dalam endometrium. Lamina propria di bagian atas endometrium bersifat seluler dan mirip jaringan mesenkim. Jaringan ikat di lapisan basal (8) tampak lebih kompak dan lebih gelap pada gambar ini. Endometrium terus berkembang selama fase proliferasi karena peningkatan kadar estrogen yang dikeluarkan oleh folikel ovarium yang tengah tumbuh. Endometrium terus berkembang selama fase proliferasi karena peningkatan kadar estrogen yang dikeluarkan oleh folikel ovarium yang tengah tumbuh. Endometrium terletak di atas miometrium (5,6) yang dipisahkan oleh jaringan ikat interstisium (9) tipis dengan banyak pembuluh darah (10). Karenanya, berkas otot terlihat pada potongan transversal, oblik dan longitudinal (Eroschenko, 2012).

## 2. Fase Sekretori (Luteal)

Siklus haid dimulai setelah ovulasi folikel matur. Estrogen dan progesterone mempengaruhi perubahan pada endometrium yang disekresi oleh korpus luteum fungsional. Endometrium menbal hingga 4 mm, disebabkan adanya hipertropi kelenjar dan peningkatan jumlah cairan. Terjadi pembengkakan kelenjar dan peningkatan jumlah getah yang berawal pada bagian basal sel yang sifatnya pekat dan kaya glikoprotein. Kelenjar tampak bergerigi dan lumen melebar. Di akhir fase, sel-sel stroma akan membesar menjadi sel desidua. Sitoplasma banyak mengandung ribosom bebas dan banyak retikulum endoplasma kasar dan glikogen. Semua sel berkumpul di sekitar arteri ulir dan pada permukaan bawah epitel (Eroschenko, 2012).



**Gambar 2.6 Fase Sekretorik**

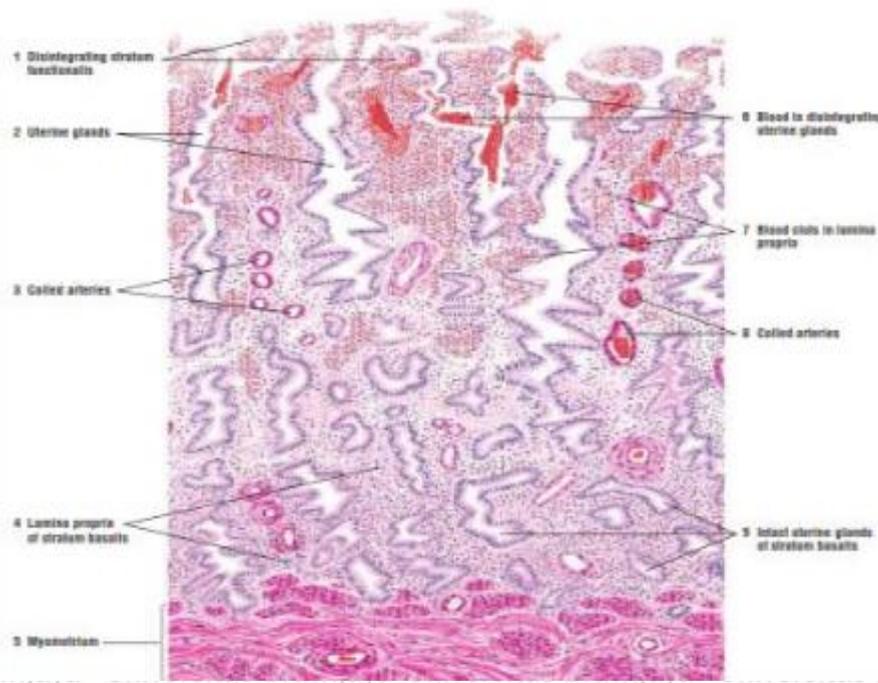
Keterangan: Perubahan yang terjadi pada endometrium terjadi karena pengaruh estrogen dan progesterone yang disekresikan oleh korpus luteum (Eroschenko, 2012).

Dari gambar 2.6 bisa dilihat gambar pada fase sekretorik (luteal) daur haid dimulai setelah ovulasi folikel matang. Perubahan-perubahan lain pada endometrium terjadi karena pengaruh estrogen dan progesterone yang disekresikan oleh korpus luteum. Karenanya, lapisan fungsional (1) dan lapisan basal (2) endometrium menjadi lebih tebal karena meningkatnya sekresi kelenjar (5) dan edema di lamina propria (6) Epitel kelenjar uterus (5,8) mengalami hipertrofi (membesar) akibat meningkatnya akumulasi produk sekresi. Kelenjar uterus juga menjadi sangat bergulung-gulung dan lumennya melebar karena bahan sekretorik gizi kaya karbohidrat. Arteri spiral (7) terus meluas ke bagian atas endometrium (lapisan fungsional) endometrium selama fase sekretorik atau luteal daur haid. Lapisan basal tidak banyak memperlihatkan perubahan. Di bawah lapisan basal terdapat myometrium (3) dengan berkas otot polos (10)

yang terpotong pada bidang longitudinal dan transversal dan pembuluh darah (10) (Eroschenko, 2012).

### 3. Fase Menstruasi

Oosit yang tidak beovulasi tidak dibuahi dan tidak terjadi implantasi di uterus, maka fase ini dimulai. Penurunan kadar estrogen dan progesterone mengakibatkan regresi korpus luteum dan menyebabkan kontriksi intermiten arteri spiralis beserta terganggunya aliran darah ke stratum fungsional endometrium. Sementara itu aliran darah ke stratum basalis tidak terganggu sehingga menjadi iskemia dan nekrosis dinding arteri serata pada lapisan fungsional endometrium. Sehingga terjadi perdarahan yang diikuti dengan lepasnya sebagian lapisan fungsional endometrium serta sisa endometrium mengkerut karena hilangnya cairan interstisial. Kemudian stratum fungsionalis yang nekrosis terlepas dari bagian endometrium dan terjadi peluruhan disebut menstruasi (Junqueria dan Carneiro, 2007 ; Eroschenko, 2012)



Gambar 2.7 Fase Menstruasi

Keterangan: Saat tidak terjadi pembuahan sel telur dan implantasi embrio, uterus memasuki fase menstruasi dan terdapat banyak perubahan sebagai persiapan implantasi pada endometrium. Selama fase ini, lapisan fungsional endometrium mengalami degenerasi dan peluruhan (Eroschenko, 2012).

Jika tidak terjadi pembuahan ovum dan implantasi mudigah, uterus masuk ke fase haid (menstruasi) dan sebagian besar persiapan yang dibuat untuk implantasi di endometrium lenyap. Selama fase haid, endometrium di lapisan fungsional (1) berdegenerasi dan terlepas. Endometrium yang terlepas mengandung fragmen-fragmen stroma, bekuan darah (7) dan kelenjar uterus. Sebagian kelenjar uterus (2) yang utuh terisi oleh darah (6). Di lapisan-lapisan endometrium yang lebih dalam, lapisan basal (4), pangkal kelenjar uterus (9), tetap utuh ketika terjadi pengelupasan lapisan fungsional dan pengeluaran darah haid. Stroma endometrium pada sebagian besar lapisan fungsional mengandung agregat eritrosit (7) yang telah keluar dari pembuluh darah yang robek dan hancur. Selain itu, stroma endometrium memperlihatkan infiltrasi limfosit dan neutrofil. Lapisan basal endometrium tidak terpengaruh selama fase ini. Bagian distal (superfisial) arteri spiral (3,8) menjadi nekrotik, sementara bagian dalamnya tetap utuh (Eroschenko, 2012).

### 2.5.3 Mekanisme Kerja Estrogen pada Endometrium

Sebagaimana hormone steroid yang lain, aksi estrogen sama yaitu masuk ke dalam sel dalam proses difusi yang selanjutnya berikatan dengan reseptor estrogen yang terdapat pada sitoplasma dan nucleus. Ikatan estrogen dengan reseptor menyebabkan terjadinya perubahan yang menghasilkan bentuk kompleks estrogen reseptor yang kemudian berikatan dengan protein koaktivator, yang memfasilitasi ekspresi gen dan memiliki afinitas tinggi terhadap DNA binding site untuk mengaktifasi transkripsi gen. Transkripsi gen yaitu oleh RNA polymerase yang menghasilkan mRNA yang kemudian ditranslasikan di

ribosomal sitoplasma sehingga menghasilkan protein yang berkaitan dengan fungsi pertumbuhan endometrium misalnya *growth factor* dan reseptor itu sendiri (Nilson, 2001).

Pada tipe sel yang berbeda dalam endometrium, maka estrogen juga mempunyai efek yang berbeda. Pada uterus menciit yang imatur yaitu usia 21 hari, kecepatan proliferasi sel sangatlah rendah. Sebagai respon terhadap siklus estrogen, proliferasi diinisiasi saat pubertas. Meskipun ER  $\alpha$  diekspresikan sangat banyak pada epitel tetapi proliferasi sel epitel sebagai respon terhadap E2 terjadi tak langsung melalui *growth factor* yang disekresikan oleh stroma yaitu mitogen bagi epitel (Cooke *et al.*, 2006).

#### 2.5.4 Peran Reseptor Estrogen terhadap Endometrium

Reseptor estrogen alpha telah diketahui memiliki efek uterotropik estrogen. Dengan menggunakan teknik rekombinasi jaringan, proliferasi sel epitel endometrium sebagai respon pada E2 terjadi secara tidak langsung melalui ER  $\alpha$  stroma yang mensekresi *growth factor* yang fungsinya parakrin sebagai pertumbuhan sel epitel endometrium (Cooke *et al.*, 2006).

E2 pada menciit yang tidak memiliki ER  $\beta$  berarti mempunyai fungsi antiproliferatif karena peningkatan proliferasi sel dan peningkatan respon yang berlebihan (pelebaran lumen, peningkatan volume dan protein pada sekresi kelenjar, complemen C3, IL-1 $\beta$  serta induksi IGF-10, VEGF (Weihua *et al.*, 2000).

### 2.6 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

#### 2.6.1 *Rattus norvegicus* Sebagai Hewan Coba

Tikus putih atau *Rattus norvegicus* biasanya banyak dimanfaatkan sebagai hewan coba pada laboratorium, karena perkembangbiakannya mudah, bisa beradaptasi dengan baik, mempunyai temperamen yang baik, mudah

dipelihara meskipun dalam jumlah yang besar, mempunyai kemampuan laktasi yang tinggi, tahan terhadap *arsenic tiroksid*, memiliki ukuran yang lebih besar daripada mencit tetapi mempunyai kemiripan pada system dan siklus reproduksi (Akbar, 2010).

Sifat dari tikus telah diketahui dengan sempurna sehingga tikus sering digunakan dalam penelitian (Nursyah, 2012). *Rattus norvegicus* lebih besar ukurannya dibandingkan dengan mencit, lebih tenang, lebih cerdas, mudah diberikan perlakuan yang wajar, kurang suka berkumpul.

Berikut ini klasifikasi dari tikus putih *Rattus norvegicus*:

Kingdom : *Animalia*  
Filum : *Chordata*  
Subfilum : *Vertebrata*  
Kelas : *Mamalia*  
Ordo : *Rodensia*  
Famili : *Muridae*  
Subfamili : *Murinae*  
Genus : *Rattus*  
Species : *norvegicus*

Tikus dewasa berumur berumur sekitar 60-90 hari dengan lama hidup sekitar 4 tahun, masa kehamilan sekitar 20-22 hari, masa menyusui 21 hari.

Jenis ini mempunyai siklus birahi (estrus) yang lebih dari 2 kali dalam setahun jadi mempunyai siklus reproduksi yang terjadi berulang-ulang dalam satu tahun.

Aktifitas reproduksi ini disebut bersifat poliestrus (Akbar, 2010).

### 2.6.2 Sistem Reproduksi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

#### 1. Ovarium

Ovarium adalah kelenjar seperti biji, pada sebelah kanan dan kiri uterus, pada bawah tuba uterin dan bagian belakang terikat mesovarium. Tempat memproduksi telur dan hormone kelamin yaitu estrogen dan progesterone.

Ovarium tikus berbentuk bulat, permukaan berbenjol-benjol, karena terdapat sel-

sel folikel dan korpus luteum. Tersusun atas bagian kortek dan medulla (Irnidayanti, 2012). Kortek terdiri atas stroma, sifatnya seluler dan mengandung folikel ovarium, sel interstisial, korpus luteum dan pembuluh darah. Sedangkan folikel terdiri dari oosit yang terselubung oleh sel folikel yang merupakan deferensiasi dari epitel germinatum. Medulla terdiri dari jaringan ikat fibroelastik yang dipenuhi dengan jaringan saraf, limfe serta pembuluh darah. Folikel telur adalah sel telur yang ditutupi sel granulosa (sel folikel) dengan tebal lapisan yang berbeda sesuai tingkat perkembangannya (Akbar, 2010). Tahap perkembangan folikel disebut sebagai fase folikuler, yang dimulai dari folikel primer (folikel primordial) yang kemudian membelah diri untuk membentuk dinding berlapis yang mengelilingi sel telur disebut sebagai sel sekunder. Folikel dikatakan matang dan disebut dengan *folikel De Graaf* jika sudah membentuk rongga (antrum) di dalam sel folikel dengan sel telur (Musahilah, 2010).

## 2. Oviduk

Peran oviduk yaitu menangkap ovum pada saat ovulasi oleh infundibulum berfimbria dan terjadi kapasitasi sperma, fertilisasi dan pembelahan embrio di ampula. Saluran penghubung antara ovarium dengan uterus dibagi menjadi beberapa bagian yaitu ismika, interstisialis, ampularis, infundibulum berfimbria (Akbar, 2010)

## 3. Uterus

Uterus adalah struktur saluran muskus yang menerima ovum yang telah dibuahi. Sebagai penyedia makanan dan pemberi perlindungan pada fetus, serta menjadi stadium permulaan ekspulsi fetus dalam persalinan. Dinding uterus dibagi menjadi tiga bagian yaitu membrane serosa (perimetrium) lapisan luar uterus berupa jaringan ikat, lapisan myometrium berupa otot polos dan lapisan

endometrium sebagai tempat nidasi, pembentukan plasenta dan perkembangan embrio (Akbar, 2010).

#### 4. Vagina

Vagina adalah tempat penampungan semen yang dikeluarkan oleh tikus jantan. Dibagi menjadi dua bagian yaitu vestibulum (bagian luar) dan posterior (bagian dalam dari muara uterus hingga servik). Terdapat mukosa, muskularis dan serosa pada dinding vagina. (Akbar, 2010).

### 2.6.3 Siklus Reproduksi Tikus Betina

Siklus estrus (birahi) adalah nama lain dari siklus reproduksi pada mamalia. Dalam siklus estrus ini terdapat periode psikologi dan fisiologis dari tikus betina mau menerima tikus jantan berkopulasi. Dalam siklus ini terdapat aktivitas yang berhubungan satu sama lain yaitu hipofisis, hipotalamus, ovarium. Waktu siklus dapat terjadi perubahan oleh karena faktor eksteroseptif yaitu suhu, cahaya, status nutrisi serta hubungan sosial (Akbar, 2010).

#### 1. Diestrus

Pada fase diestrus, epitel vagina berada dalam titik tingkat terendah yang terdiri dari stratum germinativum, yang terdiri dari lapisan basal sebagai satu lapisan sel epitel kolumnar serta lapisan spinosum. Diestrus adalah kelanjutan dari fase metestrus yang lamanya sekitar 60-70 jam dan terjadi penebalan endometrium, penipisan mukosa vagina, migrasi leukosit bertamabg banyak akibat pengaruh dari hormone progesterone dan pematangan korpus luteum (Akbar, 2010). Pada akhir fase ini terjadi penurunan infiltrasi leukosit serta proliferasi sel epitel dengan adanya penebalan epitel. Pada hapusan vagina hanya terdapat sedikit lendir dengan beberapa leukosit, sel basophil dan sel vacuola.

## 2. Proestrus

Pada fase proestrus, ditandai adanya pembentukan stratum granulosum atas stratum germinativum epitel vagina yang terdiri atas esel epitel gepeng dan mengandung banyak butiran keratohyalin. Proestrus adalah fase menjelang estrus yang berlangsung sekitar 12 jam dengan gejala birahi yang mulai muncul tetapi tikus betina tidak mau menerima tikus jantan. Selama 2 hingga 3 hari sebelum estrus, semua folikel dalam ovarium tumbuh dengan cepat, sebagai persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium, folikel de graaf dipengaruhi oleh estrogen dan FSH. Penurunan sekresi progesterone dalam darah dan peningkatan konsentrasi estrogen berakibat pada perubahan fisiologi yaitu pertumbuhan folikel, pertumbuhan endometrium yang meningkat, servik uterus, keratinisasi epitel vagina. Hal tersebut juga menyebabkan perubahan saraf dan hadirnya birahi. (Akbar, 2010). Semakin tinggi kadar estrogen maka fase proestrus juga berlangsung lebih panjang (Nursyah, 2012). Pada fase ini, hasil ulasan vagina terdapat dominasi sel epitel berinti yang muncul tunggal atau bertumpuk, sel darah putih berkurang, terdapat sel epitel bertanduk serta lendir yang banyak (Akbar, 2010),

## 3. Estrus

Estrus adalah fase kelanjutan dari proestrus. Pada fase ini lamanya sekitar 12 jam dimana tikus betina mau menerima tikus jantan dan siap untuk kopulasi. Estradiol dihasilkan oleh Folikel de Graaf yang sudah matang yang berpengaruh pada perubahan saluran reproduksi. Estrogen meningkatkan sensitivitas sel yang menghasilkan gonadotropin pada hipofisa yang fungsinya adalah

menghasilkan LH (*Luteinizing Hormone*) pada kadar tertinggi yang bisa menyebabkan ovulasi.

Pada akhir siklus estrus, terjadi ovulasi kemudian 8 hingga 11 jam setelah fase estrus, folikel berubah menjadi korpus luteum karena telur keluar dari folikel akibat terjadinya ovulasi (Akbar, 2010). Vagina berada pada fase metestrus dan fase diestrus sedangkan ovarium berada pada fase luteal yang menghasilkan progesterone. Menurut Nursyah (2012) fase estrus tidak terjadi pada tikus ovariektomi, karena kadar estrogen rendah. Kemudian fase estrus kembali terjadi setelah pemberian estrogen atau senyawa androgenik yang efeknya seperti estrogen. Selain itu pada fase ini, preparat hasil ulas vagina bisa dilihat sel leukosit dan sel epitel berinti sudah hilang.

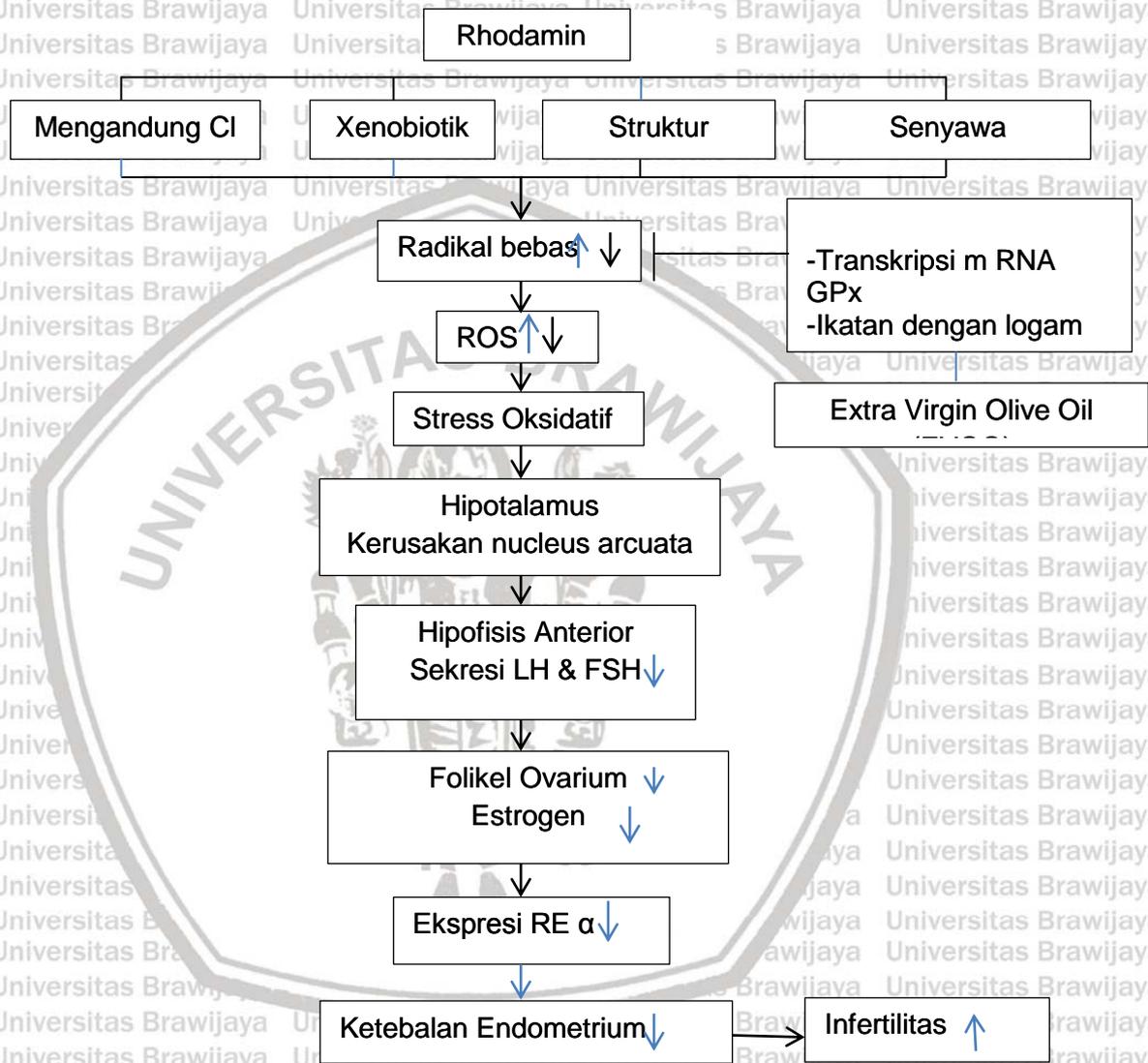
#### 4. Metestrus

Pada fase metestrus, daerah pertengahan vagina menunjukkan detasemen epitel bertanduk lengkap yang berdekatan dengan lubang vagina dan stratum granulosum menghilang dengan progresif. Akhir fase ini ditandai dengan epitel yang mencapai level terendah. Tidak terjadi perkawinan, uterus mengalami fase sekretoris sedangkan ovarium mengandung corpora luteal dan folikel-folikel kecil, sel granulosa folikel mulai tumbuh dan diperankan oleh LH dari adenohipofisa.

Fase metestrus terjadi lebih lama pada tikus ovariektomi disebabkan rendahnya kadar estrogen (Nursyah, 2012). Corpus luteum yang menghasilkan yang menghasilkan progesterone berperan penting, menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisa sehingga terjadi hambatan pada pembentukan *folikel de Graaf* dan

tidak terjadi fase estrus (Akbar, 2010). Uterus menjadi lunak pada fase ini, karena pengendoran otot dan persiapan tempat implantasi serta makanan embrio.

### 2.7 Kerangka Teori Penelitian



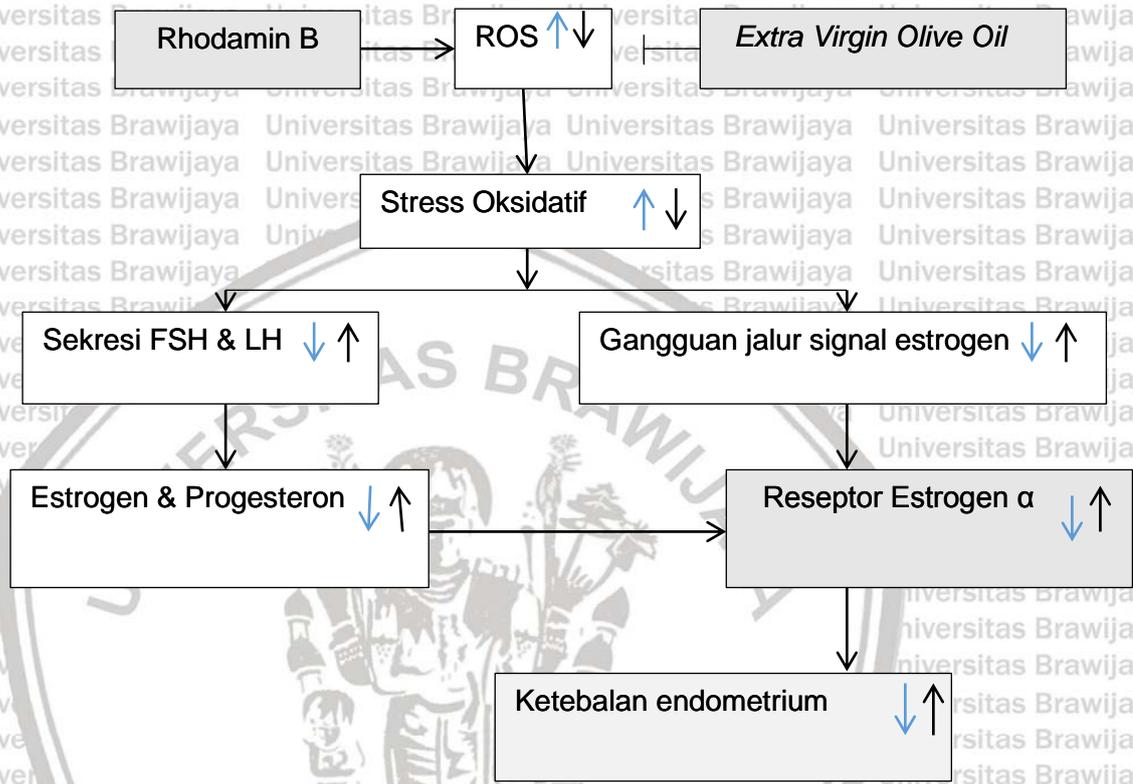
Gambar 2.8 Kerangka Teori Penelitian

Keterangan :  
 Memicu : →  
 Diberi Rhodamin B : ↑↓  
 Diberi EVOO : ↑↓

**BAB 3**

**KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1 KERANGKA KONSEP PENELITIAN**



**Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian**

Keterangan:

Diteliti :

Memicu : →

Diberi Rhodamin B : ↑↓

Diberi EVOO : ↑↓

### Keterangan Kerangka Konsep:

Berdasarkan analisis toksikologi, rhodamin B yang merupakan salah satu jenis bahan tambahan pangan dan masih banyak digunakan, diketahui terdapat banyak kandungan zat yang berbahaya. Golongan *xenobiotic* yaitu zat yang berpotensi menimbulkan toksik, masuk ke dalam tubuh melalui proses antara lain distribusi, absorbsi, metabolisme, dan ekskresi untuk mengubah hidrofilik menjadi hidrofobik. Enzim sitokrom P450 dependent oksidase memediasi proses metabolisme ini yang menghasilkan senyawa peroksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hidrogen Peroksida ( $H_2O_2$ ), Radikal Hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ). Rhodamin B menyebabkan terjadinya apoptosis jaringan di hipotalamus dan penurunan pada produksi FSH dan LH. Apoptosis hipotalamus terjadi karena adanya ketidakseimbangan rasio BAX (Bcl 2 Antagonist X/ pro apoptosis) dan BCL 2 (B cell lymphoma 2/ anti apoptosis). Kondisi ini dapat memodulasi terjadinya insufisiensi di hipotalamus, dimana hal tersebut menyebabkan penurunan sekresi GnRH sehingga mempengaruhi hipofisis anterior dalam mensekresi hormon gonadotrophin yang berperan pada proses steroidogenesis dan folikulogenesis. Penurunan dari aktivitas antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase dan katalase adalah indikasi kuat dari adanya stress oksidatif di otak.

Hidrogen peroksida tidak berbahaya pada kondisi normal, tetapi akan membentuk ikatan radikal hidroksil yang menyebabkan peningkatan ROS sehingga menimbulkan stress oksidatif, jika berikatan dengan zat toksik. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan nucleus arkuatus sehingga terjadi apoptosis hipotalamus. Insufisiensi hipotalamus menyebabkan sekresi GnRH terhambat, sehingga produksi FSH dan LH oleh hipofisis anterior terganggu. Jika sekresi FSH dan LH turun maka terjadi penurunan produksi estrogen dan progesterone yang mana kedua hormon ini memiliki peranan penting dalam

pertumbuhan siklus endometrium terutama pada ketebalannya. Peningkatan ROS secara tidak langsung menurunkan fungsi hipotalamus, hipofisis dan ovarium yang berdampak pada regenerasi endometrium, karena endometrium terbentuk oleh stroma, kelenjar dan pembuluh darah. Pemberian rhodamin B per oral, memungkinkan timbul efek pada berbagai organ reproduksi termasuk endometrium dalam bentuk kerusakan oksidatif jaringan, peningkatan peroksidasi lemak, kerusakan DNA, menyebabkan terganggunya jalur signal estrogen dan protein sehingga memperpendek siklus sel G1 pada fase proliferasi.

ER  $\alpha$  adalah reseptor yang paling dominan pada endometrium, sehingga penurunan estrogen menyebabkan penurunan ekspresi ER  $\alpha$  di endometrium, yang mengganggu stimulasi sel epitel dan stroma endometrium untuk berproliferasi, sehingga menurunkan ketebalan endometrium. Disamping itu ekspresi ER  $\alpha$  berhubungan dengan proliferasi sel dan karsinogenesis penyakit tumor dengan estrogen dependent. Endometrium harus dalam keadaan siap dan matang pada saat akan terjadi implantasi, ditandai oleh keadaan proliferasi serta diferensiasi sekresi kelenjar, edema, proliferasi vaskuler, desidualis. Penurunan ekspresi ER  $\alpha$  pada endometrium, akan mengganggu stimulasi sel epitel dan stroma endometrium untuk berproliferasi sehingga ketebalan endometrium akan menurun dan dampaknya endometrium tidak siap menjadi tempat implantasi sehingga menyebabkan infertilitas. Selain itu terdapat beberapa keadaan yang menyebabkan perubahan pada ketebalan endometrium yaitu pemakaian kontrasepsi, menopause, defek fase luteal, keadaan patologi uterus yang menyebabkan hiperplasia endometrium dan keganasan endometrium

Dengan pemberian antioksidan eksogen, yang menggunakan *Extra Virgin Olive Oil*, maka akan bekerja memotong reaksi oksidasi berantai. *Extra Virgin*

*Olive Oil* memiliki tingkat kandungan flavonoid yang tinggi. Cara kerja dari antioksidan ini yaitu membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas. *Extra Virgin Olive Oil* ini termasuk dalam golongan antioksidan non enzimatis yang bersifat preventif dengan merusak pembentukan oksigen yang reaktif.

Dampak pemberian EVOO yang diharapkan pada organ reproduksi yaitu sebagai terapi terjadinya disfungsi hipotalamus, hipofisis dan ovarium, karena , mengkonsumsi zat yang mengandung rhodamin B, sehingga siklus normal reproduksi berdampak pada fertilitas perempuan yang berlangsung optimal.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

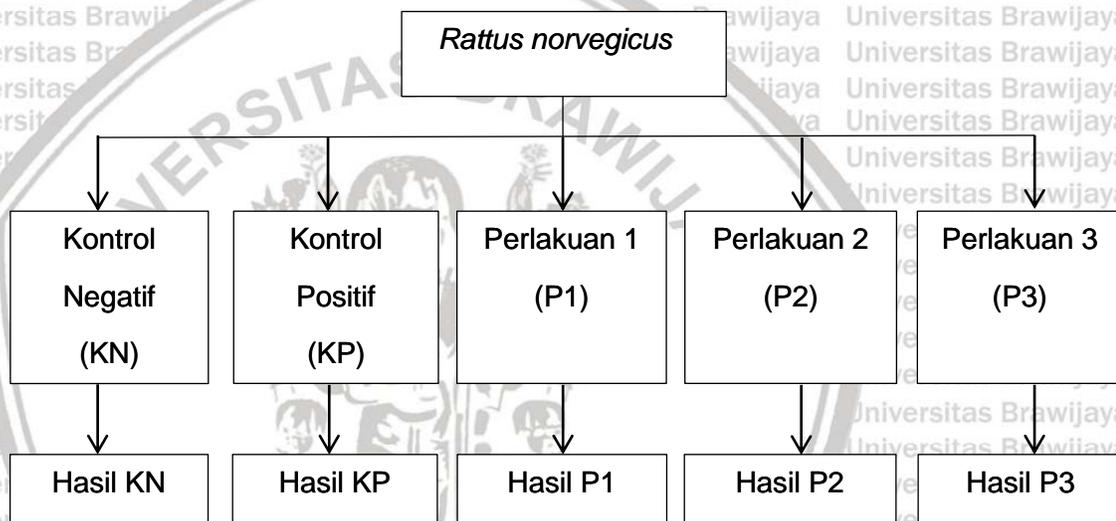
1. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
2. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
3. Terdapat hubungan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
4. Terdapat hubungan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan *true experimental* dengan menggunakan pendekatan *post test only control group design*.



Gambar 4.1 Rancangan Penelitian

Keterangan Gambar

- KN: Kelompok Kontrol Negatif (Tanpa diberikan EVOO dan Rhodamin B)
- KP: Kelompok Kontrol Positif (Tanpa diberikan EVOO dan dipapar Rhodamin B)
- P1: Kelompok Perlakuan 1 (Diberikan EVOO dosis 1 yaitu 1,5 mL/Kg BB/hari dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari selama 36 hari)
- P2: Kelompok Perlakuan 2 (Diberikan EVOO dosis 2 yaitu 3 mL/Kg BB/hari dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari selama 36 hari)
- P3: Kelompok Perlakuan 3 (Diberikan EVOO dosis 3 yaitu 4,5 mL/Kg BB/hari dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari selama 36 hari)

Hasil KN: Hasil pemeriksaan tebal endometrium dan reseptor estrogen  $\alpha$  pada kelompok control negatif.

Hasil KP: Hasil pemeriksaan tebal endometrium dan reseptor estrogen  $\alpha$  pada kelompok control positif.

Hasil P1: Hasil pemeriksaan tebal endometrium dan reseptor estrogen  $\alpha$  pada kelompok perlakuan 1.

Hasil P2: Hasil pemeriksaan tebal endometrium dan reseptor estrogen  $\alpha$  pada kelompok perlakuan 2.

Hasil P2: Hasil pemeriksaan tebal endometrium dan reseptor estrogen  $\alpha$  pada kelompok perlakuan 3.

## 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian selama tiga bulan yaitu bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2018.

## 4.3 Sampel Penelitian

### 4.3.1 Kriteria Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) berdasarkan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi.

### 4.3.2 Kriteria Inklusi

1. Usia 10-12 minggu
2. Kondisi sehat dan gerakan aktif
3. Jenis kelamin betina

### 4.3.3 Kriteria Eksklusi

1. Tampak sakit saat sebelum dan selama perlakuan
2. Hewan coba mati saat penelitian berlangsung

#### 4.3.4 Besar Sampel

Dalam penelitian ini, besar sampel disebut sebagai replikasi. Replikasi adalah banyaknya unit eksperimen yang mendapat perlakuan yang sama pada kondisi tertentu (Zainuddin, 2011). Besar sampel yang diperlukan dalam setiap perlakuan ditentukan dengan rumus Hanafiah (2012).

Rumus Replikasi:

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

t = jumlah perlakuan

r = jumlah ulangan

Penelitian ini menetapkan 5 kelompok perlakuan sehingga nilai r adalah:

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

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r \geq 19 : 4$$

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

Jadi jumlah sampel hewan coba dalam setiap kelompok perlakuan adalah 5 ekor tikus, tetapi sebagai antisipasi hewan coba yang digunakan mati, maka ditambahkan masing-masing 1 hewan coba sehingga jumlah sampel keseluruhan menjadi 30 ekor.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

*Extra Virgin Olive Oil*

#### 4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  dan Ketebalan endometrium

#### 4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No.	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Data
1	Independent		
	a. Rhodamin B	Zat pewarna sintetis rhodamin B dengan dosis 18 mg/200g BB/hari yang dilarutkan dengan 1 ml aquadest. Diberikan melalui oral menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde, diberikan 1 kali dalam sehari pada pagi hari, dalam waktu 36 hari. Penentuan dosis dan waktu pemaparan berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Suciati (2013), Safitri <i>et al.</i> , (2015).	
	b. Ekstra Virgin Olive Oil	<i>Extra Virgin Olive Oil</i> dengan persentase kemurnian 100% minyak zaitun dengan merk Borges hasil produksi Spanyol dan dibeli di salah satu toko herbal di Malang. Dosis yang diberikan adalah 1,5, 3 dan 4,5 mL/KgBB/hari diberikan per oral selama 36 hari, diberikan pada sore hari. Dosis ini mengacu	



pada penelitian sebelumnya yaitu Nugraheni (2012).

## 2. Independent

a. Ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$

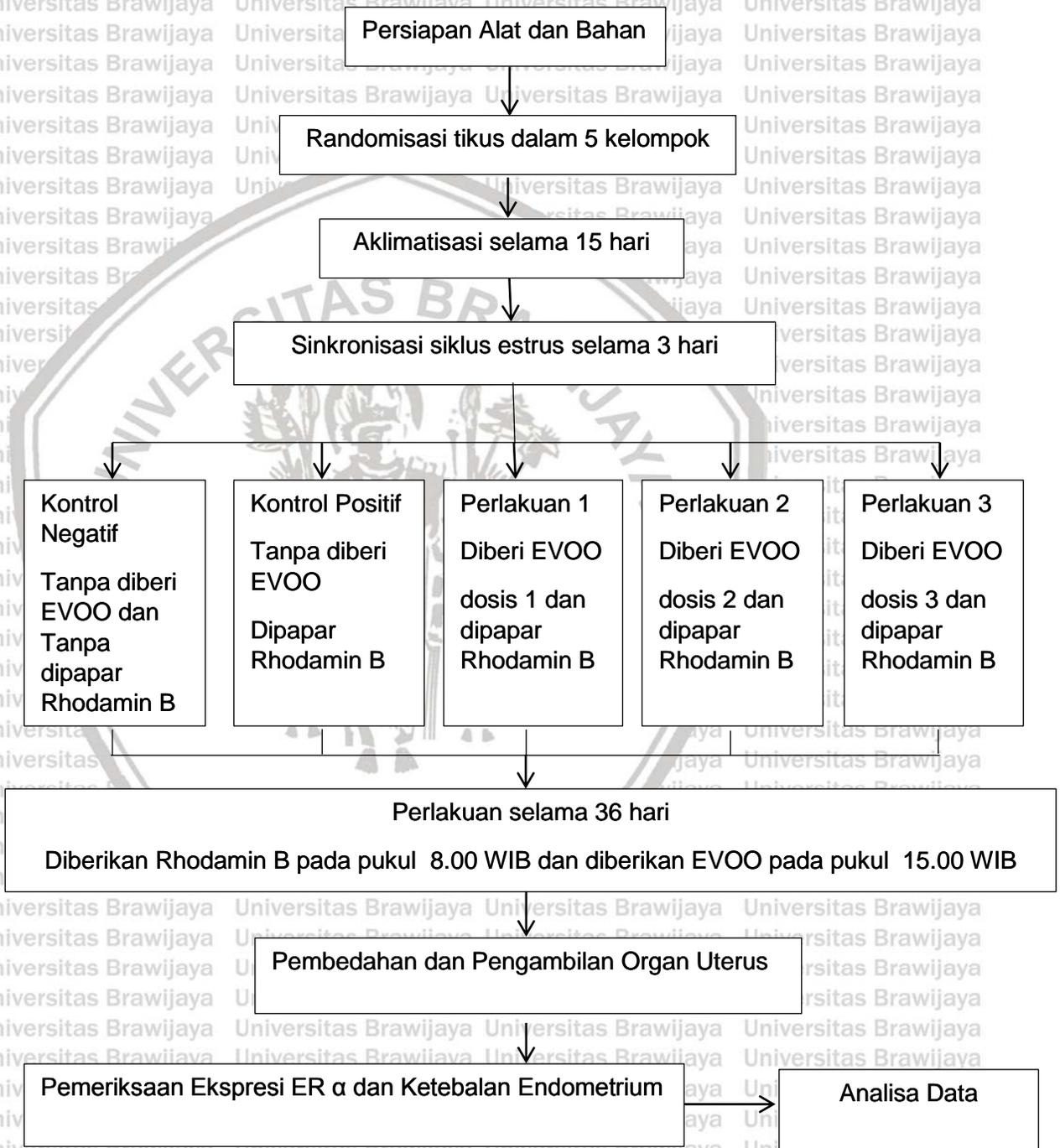
Sel yang mengekspresikan ER  $\alpha$  di endometrium dengan pengecatan antibodi ER  $\alpha$ , menggunakan *immunostaining kit*. Kemudian difoto dengan mikroskop Olympus perbesaran 400x dalam 10 lapang pandang, hasil diperoleh dengan menggunakan *software immunoratio* berupa persentase. Inti sel yang terekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  terlihat berwarna coklat terdapat di sel kelenjar maupun stroma.

b. Ketebalan Endometrium

Ketebalan endometrium menggunakan pewarnaan HE, diukur dengan menghitung rerata dari endometrium dengan ukuran 5 titik tebal tertinggi dan 5 titik terendah pada setiap sayatan. Diukur dari lumen epitel sampai lapisan basalis endometrium, dengan *Dot slide mikroskop Olympus* perbesaran 400x, satuan menggunakan  $\mu\text{m}$ .

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.2 Diagram Alur Penelitian

#### 4.6.2 Aklimatisasi dan Pemeliharaan Tikus

Tikus perlu dilakukan aklimatisasi yaitu adaptasi selama 15 hari untuk mengkondisikan tikus dengan suasana di Laboratorium dan menghilangkan stres.

Selama masa ini tikus diberikan makan dan minum dengan pakan standar. Tikus ditempatkan pada kandang dengan suhu kamar 27-28 ° C, kandang berupa box plastik berukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang dialasi sekam padi, dibersihkan atau diganti setiap dua hari sekali. Kandang ditutup dengan kawat berjaring.

#### 4.6.3 Pengorbanan Tikus

Tikus diberikan injeksi ketamine 1-2 mg/tikus dan ditunggu beberapa menit hingga tikus benar-benar mati.

#### 4.6.4 Pengambilan Organ Uterus

Alat dan Bahan:

- a. Pinset
- b. Gunting
- c. Formalin 10%

Prosedur:

- a. Tikus yang telah mati diletakkan diatas papan dengan perut menghadap ke atas, kemudian difiksasi engan jarum pentul yang ditancapkan pada keempat telapak kaki.
- b. Dengan menggunakan pinset dan gunting, dinding perut dibuka dengan sayatan pada garis tengah yang di lanjutkan ke arah samping kanan dan kiri pada sisi atas dan bawah. Kemudian uterus dibuka dengan cara

menggunting tepat pada bagian isthmus tuba fallopii kanan dan kiri pada bagian bawah (batas antara uterus dan servik).

c. Uterus dibersihkan dari ligamen-ligamen yang melekat. Kemudian dibersihkan dari darah menggunakan NaCl 0,9 % dan ditiriskan memakai kertas saring dengan satu kali tekanan.

d. Setelah air pada organ mengering, uterus ditimbang dengan grade analitik kemudian dipisahkan antara tandur uterus kiri dan kanan.

e. Selanjutnya dimasukkan ke dalam botol berisi fixative buffer formalin 10% kemudian direndam 12-24 jam.

f. Organ siap diproses menjadi preparat

g. Bangkai tikus kemudian dikubur dengan kedalaman 0,5 meter.

#### 4.6.5 Pembuatan Hispatologi

a. Proses Pematangan Jaringan berupa Makros

1. Jaringan uterus difiksasi menggunakan larutan buffer formalin 10%

2. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang diteliti

3. Jaringan dipotong dengan ketebalan 2-3 mm

4. Jaringan dimasukkan ke kaset kemudian diberi kode yang sesuai dengan gros peneliti

5. Jaringan dimasukkan ke dalam formalin 10%

6. Diproses/ dimasukkan pada mesin Tissue Tex Prosesor selama 80 menit

7. Saat alarm berbunyi berarti tanda selesai.

b. Proses Pengeblokan dan Pematangan Jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor

2. Jaringan di blok dengan paraffin dan disesuaikan dengan kode jaringan

3. Jaringan dipotong menggunakan alat microtome dengan ketebalan sebesar

5 mikron

c. Proses Deparaffinasi

Setelah disayat/ dipotong secara longitudinal dengan ketebalan 3-5 mikron

kemudian ditempatkan ke dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80 °C,

selanjutnya dimasukkan ke dalam 2 tabung xylol dengan lama masing-masing

20 menit, kemudian dimasukkan ke dalam 4 tabung alcohol masing-masing

selama 3 menit. Terakhir dimasukkan ke air mengalir selama 15 menit.

d. Proses Pewarnaan Hematoksilin (HE)

1. Cat Utama Harris Hematoksilin 10-15 menit

2. Mencuci dengan air mengalir 15 menit

3. Alkohol asam 1% 2-5 celup

4. Amonia cair 3-5 celup

5. Cat pembanding Eosin 1% 10-15 menit

e. Dehidrasi

1. Alkohol 70% selama 3 menit

2. Alkohol 80% selama 3 menit

3. Alkohol 96% selama 3 menit

4. Alkohol absolut selama 3 menit

f. Penjernihan

1. Xylol I selama 60 menit

2. Xylol II selama 60 menit

g. Mounting dengan Entelan dan Deckglass

1. Membiarkan slide mengering pada suhu ruangan kemudian diamati.

#### 4.6.6 Pengukuran Ketebalan Endometrium

Sebelum dilakukan pengukuran, terlebih dahulu mengkonsultasikan preparat histologi endometrium kepada ahli Patologi Anatomi untuk pembacaan hasil preparasi batas ketebalan endometrium dari lumen epitel sampai lapisan basalis endometrium. Sediaan jaringan endometrium yang dipotong longitudinal dan diwarnai dengan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin) untuk mengukur ketebalannya. Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan mikroskopis menggunakan dot slide microscope Olympus XC 10 dengan pembesaran 400x, pengukuran dibagi menjadi 5 kuadran kemudian diukur pada 10 titik, selanjutnya dihitung secara *live auto exported to Microsoft excel* dan hasil perhitungan dirata-rata kemudian dijumlahkan sehingga menghasilkan satu data untuk satu kelompok perlakuan.

#### 4.6.7 Pemeriksaan Ekspresi Reseptor Estrogen $\alpha$

Pemeriksaan Ekspresi ER  $\alpha$  menggunakan IHC

Alat:

1. Slide
2. Antibodi Primer reseptor  $\alpha$
3. Kit Imunohistokimia
4. Mikropipet
5. Tip

6. Tube ependov
7. Tabung reaksi
8. Mikroskop
9. Handscoon
10. Aluminium foil

#### Cara Kerja:

##### a. Antigen Retrival dengan Buffer Sitrat

Buffer Sitrat disiapkan dengan aquades hingga batas 50 ml. Memasukkan chamber yang berisi larutan buffer sitrat dan aquades dalam waterbath selama 20 menit, Ph buffer sitrat diatur menjadi 6.0. Kemudian setelah 20 menit menutup waterbath dan slide direndam dalam chamber, waterbath kembali ditutup pada suhu 95°C selama 20 menit. Slide dikeluarkan dari waterbath dan ditunggu dalam suhu ruang hingga 20 menit, kemudian dibilas dengan aquades dan slide dicuci dengan PBS (3 X 5 menit)

##### b. *Immuno Histro Chemistry (IHC)*

Hari ke 1

Slide siap dicuci

Blocking enzyme endogen dengan menambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dilarutkan ke dalam methanol, kemudian diinkubasi dalam staining chamber selama 15 menit. Pada proses ini digunakan methanol sebagai pelarut sehingga mudah menguap dan jaringan mudah kering. Jaringan perlu dijaga agar tidak kering selama inkubasi dengan melebihi larutan. Setelah diinkubasi selama 15 menit, dicuci menggunakan PBS steril 3x5 menit, diusap sekeliling jaringan dengan tissue tanpa menyentuh jaringan.

### - Bloking Unspesifik Protein

Bloking unspesifik protein menggunakan sniper (dari kit) ditambahkan 0.25% triton dalam buffer PBS + FBS selama 60 menit dalam suhu ruang lalu di inkubasi dalam staining chamber selama 15 menit pada suhu ruang. Penambahan sebagai opsonin, bertujuan untuk mempermudah penetrasi antibody ke dalam jaringan. Selanjutnya dicuci PBS steril 3x5 menit, diusap sekeliling jaringan dengan tissue tanpa menyentuh jaringan.

### - Inkubasi antibodi primer

Ditambahkan antibodi primer yang dilarutkan dalam PBS 5% + 5% FBS. Menggunakan antibodi reseptor estrogen  $\alpha$ . Lalu diinkubasi dalam staining chamber pada suhu 4°C overnight.

### Hari ke 2

Slide dikeluarkan dari suhu 4°C lalu ditunggu dengan suhu ruangan dan dicuci PBS steril 3x5 menit, diusap sekeliling jaringan menggunakan tissue tanpa menyentuh jaringan.

### - Inkubasi antibodi sekunder (biotin conjugat)

Ditambahkan antibodi sekunder, selanjutnya diinkubasi dalam staining chamber selama 60 menit pada suhu ruang. Antibodi sekunder yang digunakan dari kit trekie. Lalu dicuci dengan PBS steril 3x5 menit dan diusap sekeliling jaringan menggunakan tissue tanpa menyentuh jaringan.

### - Inkubasi SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*)

Ditambahkan SA-HRP lalu di inkubasi dalam 40 menit dalam staining chamber pada suhu ruang. Tujuannya untuk memperkuat ikatan antigen dengan antibodi. Lalu slide dicuci dengan PBS, diusap sekeliling dengan tissue tanpa menyentuh jaringan.

- Aplikasi *Chromagen* DAB (Diaminobenzidine)

Ditambahkan DAB dari kit (DAB Chromagen; DAB buffer = 1:40). Lalu di inkubasi dalam staining chamber 10-20 menit pada suhu ruang. Hasilnya akan terekspressi dengan warna coklat, lalu dicuci dengan aquadest 3x5 menit dan sekeliling jaringan diusap menggunakan tissue tanpa menyentuh jaringan.

- *Counterstain* dengan *Mayer's Hematoxilen*

Ditambahkan Mayer 40  $\mu$ l pada tiap slide kemudian ditetaskan aquades  $\pm$  2 tetes, slide yang masih terendam mayer diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x, jika inti sudah terlihat berwarna coklat maka segera dibilas dengan aquades selama 5 menit. Tujuan dari Mayer ini adalah mewarnai bagian yang tidak berwarna dan hasilnya akan terekspressi warna ungu.

- *Mounting* dengan entelan

Slide diangin-anginkan agar kering kemudian ditetesi etelan dan ditutup dengan overglass. Hasilnya dapat dilihat esok hari dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Untuk menghitung persentasenya digunakan foto dotslide software Olympus, perhitungan persentase menggunakan software imunoratio.

#### 4.7 Analisa Data

Pada analisa data ini digunakan beberapa rangkaian yaitu menguji normalitas data menggunakan Uji Shapiro Wilk. Untuk melihat normalitas data, digunakan pengujian ini sebagai prasyarat menggunakan Uji Parametrik atau Non Parametrik. Kesimpulan data berdistribusi normal dengan kriteria pengambilan keputusan p value  $> 0.05$ .

Uji homogenitas sampel menggunakan Uji Leuvene's yang bertujuan untuk mengetahui homogenitas sampel, dengan pengambilan keputusan p  $> 0.05$  adalah homogeni atau sebaliknya.

Uji hipotesis selanjutnya menggunakan One Way Anova yang membandingkan rerata variable terukur antara kelompok sampel dengan kelompok perlakuan. Analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu uji beda nyata terkecil/ BNT (LSD). Untuk melihat nilai pengaruh, digunakan analisis regresi. Selanjutnya digunakan koefisien korelasi untuk mengetahui kuat atau tidaknya hubungan linier antara dua variable. Semua uji menggunakan perhitungan SPSS.

## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

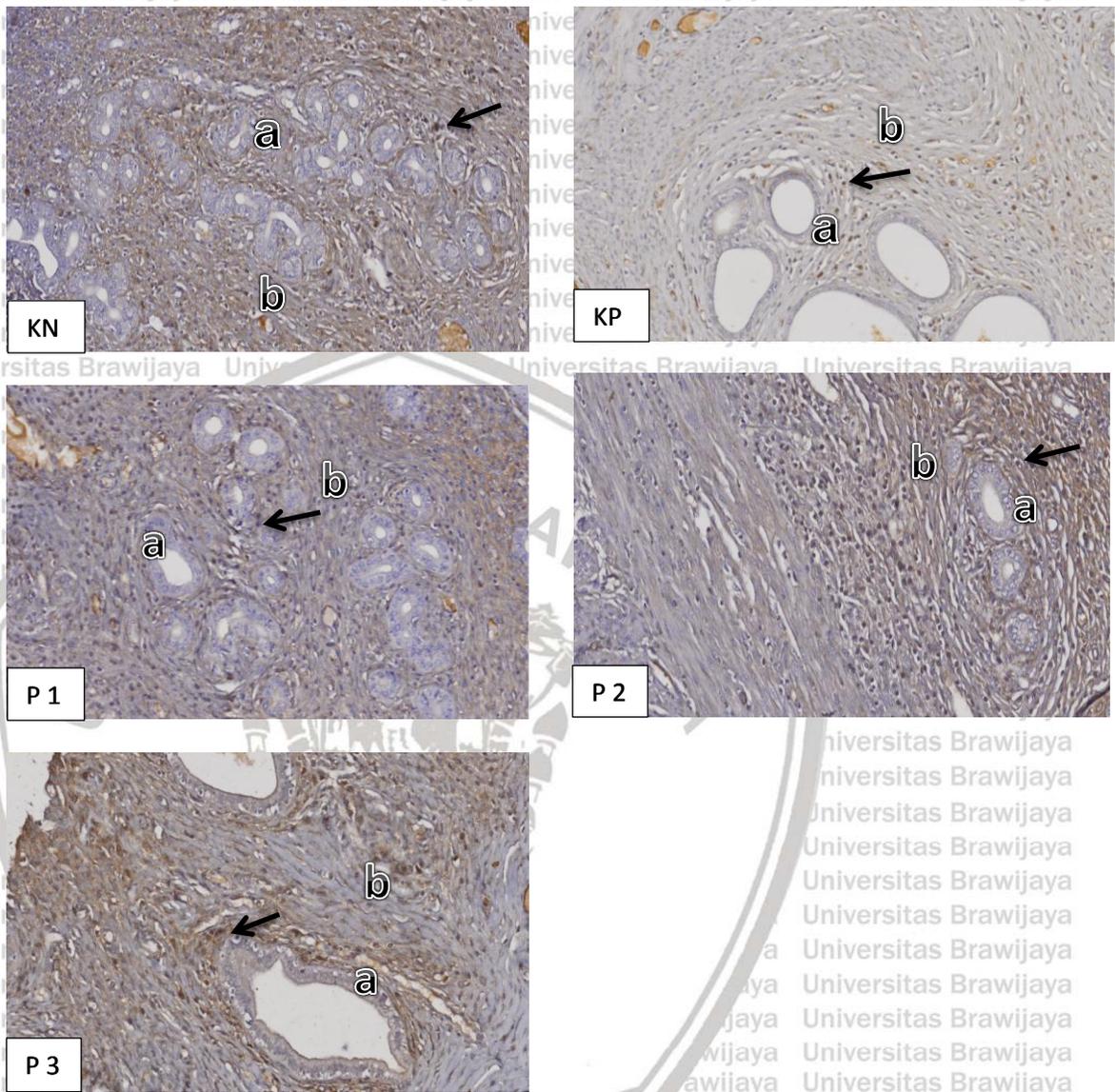
## 5.1 Karakteristik Subjek

Penelitian dilakukan di laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian menggunakan sampel 25 tikus putih betina yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Tikus didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dalam perjalanan penelitian terdapat 3 ekor tikus yang mati pada saat pemberian perlakuan, sehingga jumlah tikus menjadi 27 ekor, karena jumlah dalam tiap kelompok ada 6 ekor tikus sedangkan sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.

5.2. Hasil Pengukuran Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang diberikan *Extra Virgin Olive Oil* dan dipapar Rhodamin B

Hasil pengamatan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  dengan menggunakan foto mikroskop *Olympus XC10*, pembesaran 400x dalam 10 lapang pandang dan dihitung dengan menggunakan *software immunoratio*



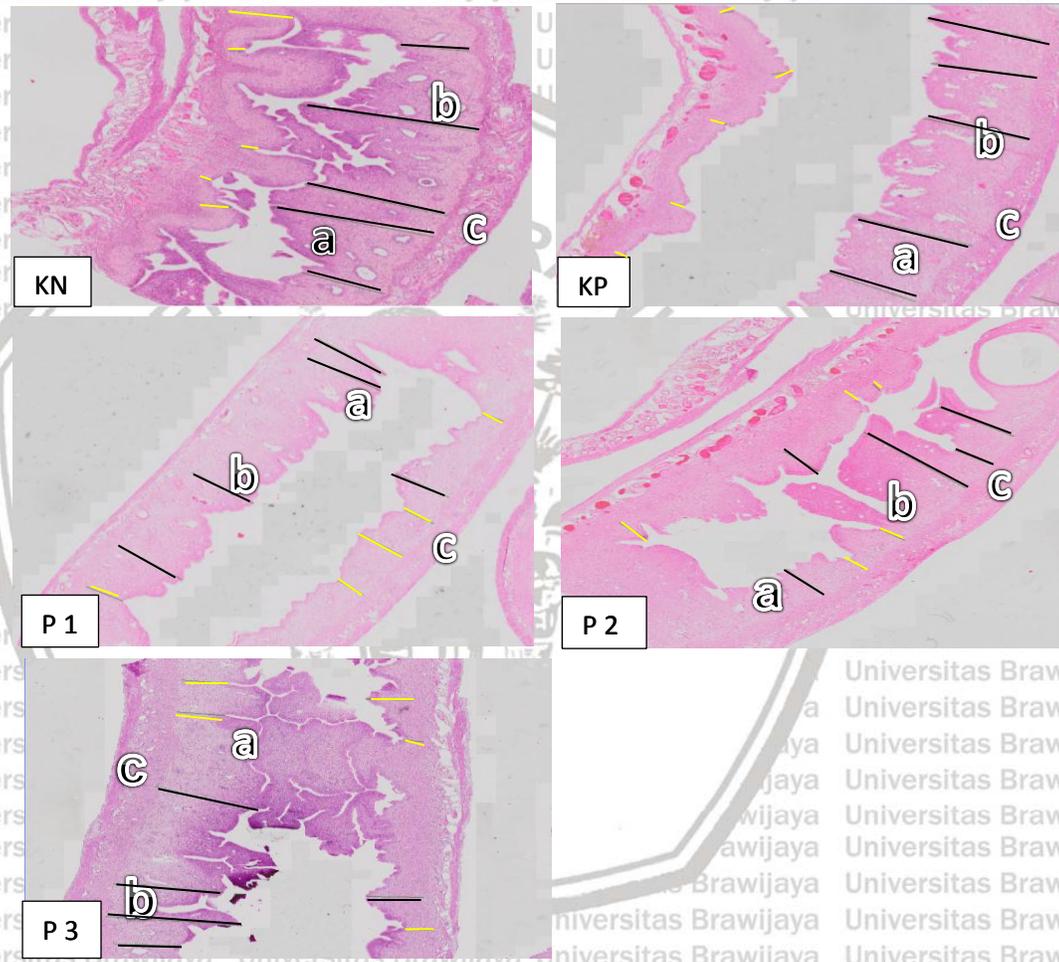
**Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Mikroskopis Ekspresi ER  $\alpha$**

Keterangan: a.Kelenjar b.Stroma

Pemeriksaan ER  $\alpha$  dengan immunohistokimia dengan pengamatan menggunakan mikroskop Olympus XC10, pembesaran 400x dengan 10x lapang pandang, dihitung menggunakan *software immunoratio*. Tanda panah menunjukkan inti sel berwarna coklat yang mengekspresikan ER $\alpha$ .

**5.3 Hasil Penelitian Ketebalan Endometrium pada *Rattus norvegicus* yang diberikan *Extra Virgin Olive Oil* dan dipapar Rhodamin B.**

Pengecatan endometrium dengan menggunakan *Hematoxilin Eosin* kemudian diukur ketebalannya pada 10 titik yaitu 5 titik tertinggi dan 5 titik terendah, kemudian diambil rata-rata.



**Gambar 5.2 Hasil Pengamatan Mikroskopis Ketebalan Endometrium**

Keterangan: a. Endometrium b. Miometrium c. Perimetrium

Gambaran mikroskopis endometrium dari tikus dengan pewarnaan HE dan pengamatan dengan mikroskop dengan pembesaran 400x pada 10 titik yaitu 5 titik tertinggi dan 5 titik terendah. Pengukuran ketebalan endometrium pada titik tertinggi ditunjukkan dengan garis hitam, sedangkan pada titik terendah ditunjukkan dengan garis kuning.

#### 5.4 Hasil Analisis Ekspresi Reseptor Estrogen $\alpha$

Pengujian yang dilakukan menggunakan metode uji beda rata-rata yaitu uji One Way Anova (untuk lebih dari 2 kelompok perlakuan). Sebelum dilakukan pengujian tersebut, ada asumsi yang mendasari yaitu normalitas data dengan menggunakan uji Shapiro Wilk, dan uji homogenitas ragam antar kelompok dengan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji Kruskal Wallis. Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

$H_0$ : Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur;

$H_1$ : Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan variabel yang diukur.

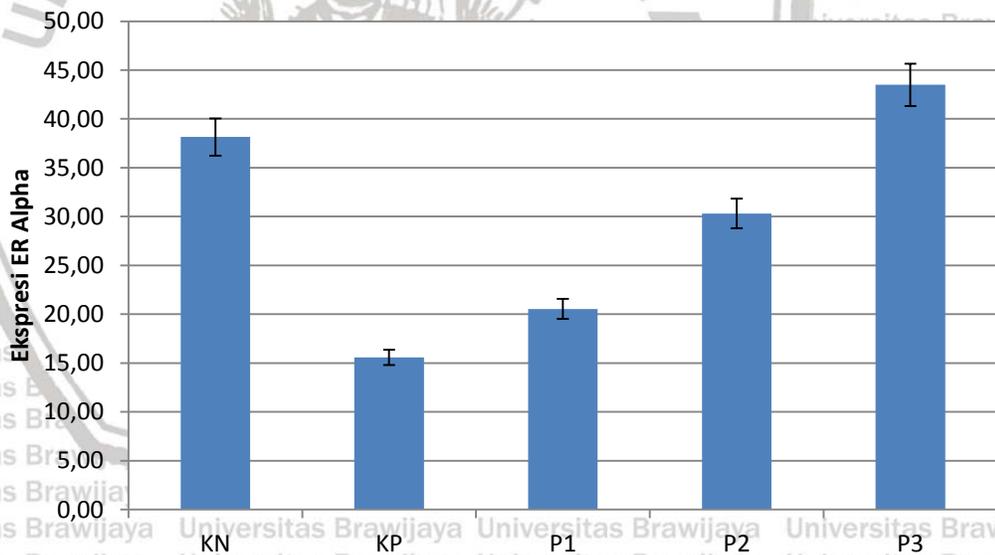
Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

jika nilai signifikansi  $< 0,05$ , maka  **$H_0$  ditolak** ;

jika nilai signifikansi  $> 0,05$ , maka  **$H_0$  diterima**.

**Tabel 5.1 Rata-rata Ekspresi ER  $\alpha$  pada masing-masing perlakuan**

Perlakuan	Rata-rata (%)	Standard Deviasi	Notasi
KN (Tanpa diberikan EVOO dan rhodamin B)	38,150	0,888	d
KP (Tanpa diberikan EVOO dan dipapar rhodamin B)	15,576	1,492	a
P1 (Diberikan EVOO dosis 1 yaitu 1.5 ml/200 kg BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB selama 36 hari)	20,540	0,876	b
P2 (Diberikan EVOO dosis 2 yaitu 3 ml/200 kg BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB selama 36 hari)	30,306	1,794	c
P3 (Diberikan EVOO dosis 3 yaitu 4.5 ml/200 kg BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/ 200 g BB selama 36 hari)	43,486	3,362	e
Signifikansi normalitas	= 0,053		
Signifikansi homogenitas	= 0,007		



**Gambar 5.3 Rata-rata Angka Ekspresi ER  $\alpha$  pada masing-masing perlakuan**

Berdasarkan gambar 5.3 terlihat bahwa rata-rata angka ekspresi ER  $\alpha$  tertinggi pada perlakuan P3 sebesar 43,486 $\pm$ 3,362, dan rata-rata angka Ekspresi ER  $\alpha$  terendah pada perlakuan KP yaitu sebesar 15,576 $\pm$ 1,492. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata angka Ekspresi ER  $\alpha$  antar

perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik One Way Anova, tetapi terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya.

Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari  $\alpha$  (0,05), maka data berdistribusi normal. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data yang lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi asumsi homogenitas, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18 dengan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.2 Hasil Uji Kruskal Wallis Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$**

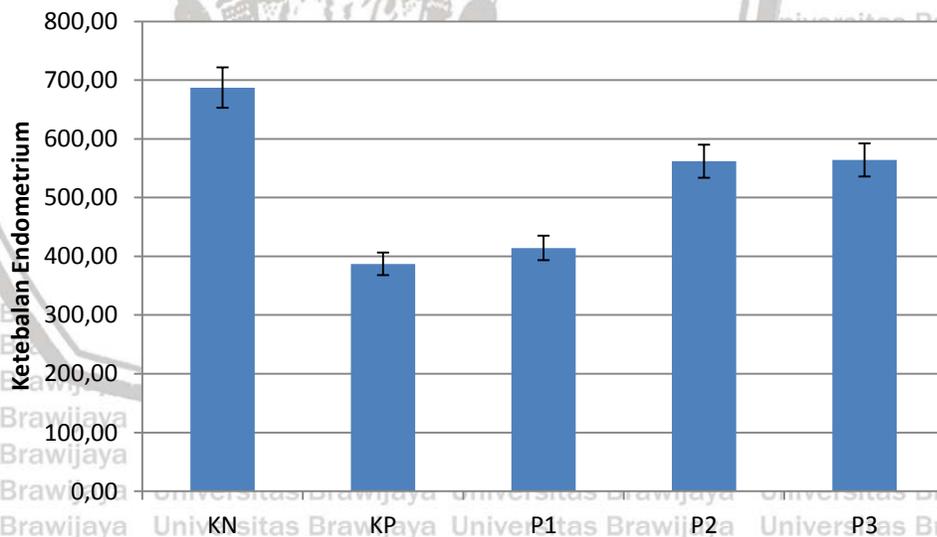
Chi-square hitung	Signifikansi	Kesimpulan
22,737	0,000	Signifikan

Berdasarkan hasil yang tercantum pada tabel 5.2 diperoleh nilai signifikansi yang lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka Ekspresi ER  $\alpha$  pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney dengan hasil notasi pada tabel 5.1. Dari kolom notasi tersebut diperoleh bahwa antar perlakuan menunjukkan hasil berbeda signifikan dengan notasi yang berbeda antar perlakuan.

**5.5 Hasil Analisis Ketebalan Endometrium**

**Tabel 5.3 Rata-rata Ketebalan Endometrium pada masing-masing perlakuan**

Perlakuan	Rata-rata ( $\mu$ )	Standard Deviasi	Notasi
KN (Tanpa diberikan EVOO dan Rhodamin B)	687,204	223,727	C
KP (Tanpa diberikan EVOO dan dipapar Rhodamin B)	387,064	130,450	A
P1 (Diberikan EVOO dosis 1 yaitu 1,5 ml/200g BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg selama 36 hari)	414,268	38,083	Ab
P2 (Diberikan EVOO dosis 1 yaitu 3 ml/200g BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg selama 36 hari)	561,836	76,668	C
P3 (Diberikan EVOO dosis 1 yaitu 4,5 ml/200g BB dan dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg selama 36 hari)	564,264	110,513	Bc
Signifikansi normalitas	= 0,240		
Signifikansi homogenitas	= 0,023		



**Gambar 5.4 Rata-rata angka Ketebalan Endometrium pada masing-masing perlakuan**

Berdasarkan tabel 5.3 dapat terlihat bahwa rata-rata angka ketebalan endometrium tertinggi pada perlakuan Kontrol Negatif (KN) sebesar

687,204±223,727, dan rata-rata angka ketebalan endometrium terendah pada perlakuan Kontrol Positif (KP) yaitu sebesar 387,064±130,450. Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan signifikan rata-rata angka ketebalan endometrium antar perlakuan, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik One Way Anova, tetapi terlebih dahulu diuji normalitas dan homogenitasnya.

Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi lebih besar dari  $\alpha$  (0,05), maka data berdistribusi normal. Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05) membuktikan ragam data tidak homogen. Karena data yang digunakan tidak memenuhi asumsi homogenitas, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti Kruskal Wallis. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18 dengan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.4 Hasil uji Kruskal Wallis Ketebalan Edometrium**

Chi-square hitung	Signifikansi	Kesimpulan
11,505	0,021	Signifikan

Berdasarkan hasil yang tercantum pada tabel 5.4, diperoleh nilai signifikansi yang lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka ketebalan endometrium pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji Mann Whitney dengan hasil notasi pada tabel 5.3. Dari kolom notasi tersebut diperoleh hasil sebagai berikut:

- a. Kontrol Negatif (KN) (c) berbeda nyata dengan KP, dan P1. KN tidak berbeda nyata dengan P2 dan P3.
- b. Kontrol Positif (KP) (a) berbeda nyata dengan KN, P2, dan P3. KP tidak berbeda nyata dengan perlakuan P1.

- c. Perlakuan 1 (P 1) (ab) berbeda nyata dengan KN dan P2. P1 tidak berbeda nyata dengan KP, dan P3.
- d. Perlakuan 2 (P2) (c) berbeda nyata dengan KP dan P1, P2 tidak berbeda nyata dengan KN dan P3.
- e. Perlakuan 3 (P3) (bc) berbeda nyata dengan KP. P3 tidak berbeda nyata dengan P1, KN dan P2.

## 5.6 Hasil Analisis Koefisien Korelasi

Untuk mengetahui hubungan antara *Extra Virgin Olive Oil* dengan Ekspresi ER  $\alpha$ , dan hubungan *Extra Virgin Olive Oil* dengan ketebalan Endometrium, maka selanjutnya dilakukan analisis korelasi Pearson. Sebelum dilakukan pengujian tersebut, ada asumsi yang mendasari yaitu normalitas dengan menggunakan uji Shapiro Wilk. Jika data yang digunakan tidak memenuhi asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji korelasi Rank Spearman. Hipotesis yang digunakan adalah:

$H_0$  : Terdapat hubungan yang tidak signifikan;

$H_1$  : Terdapat hubungan yang signifikan.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

jika nilai signifikansi  $< 0,05$ , maka  $H_0$  ditolak ;

jika nilai signifikansi  $> 0,05$ , maka  $H_0$  diterima.

### 5.6.1 Hubungan *Extra Virgin Olive Oil* dengan Ekspresi ER $\alpha$

Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi data *Extra Virgin Olive Oil* dan ekspresi ER  $\alpha$  lebih kecil dari  $\alpha$  (0.05), yang berarti data tersebut tidak berdistribusi normal. Karena data yang digunakan tidak

memenuhi asumsi normalitas, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti dengan korelasi rank spearman. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18 dengan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.5 Hasil Analisis korelasi rank spearman EVOO dengan Ekspresi ER  $\alpha$**

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
0,969	0,000	Signifikan

Pada uji korelasi spearman didapatkan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara *Extra Virgin Olive Oil* dengan ekspresi ER  $\alpha$  yang diukur. Hubungan searah antara dosis dengan ekspresi ER  $\alpha$  pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *correlation* yang positif. Menurut Arikunto (2010), nilai korelasi yang berada diantara 0,80 – 1,00 masuk dalam kategori korelasi tinggi.

**5.6.2 Hubungan *Extra Virgin Olive Oil* dengan Ketebalan Endometrium**

Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi data ketebalan endometrium lebih besar dari  $\alpha$  (0,05), yang berarti data tersebut berdistribusi normal, tetapi data *Extra Virgin Olive Oil* memiliki nilai signifikansi lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05), yang berarti data tersebut tidak berdistribusi normal. Karena data yang digunakan tidak memenuhi asumsi normalitas, maka selanjutnya dilakukan pengujian pengganti dengan korelasi Rank Spearman. Pengujian ini dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 18 dengan hasil sebagai berikut:

**Tabel 5.6 Hasil Analisis korelasi Rank Spearman EVOO dengan Ketebalan Endometrium**

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
0,605	0,005	Signifikan

Pada uji korelasi Spearman didapatkan nilai signifikansi 0,005 lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara *Extra Virgin Olive Oil* dengan ketebalan endometrium yang diukur. Hubungan searah antara dosis dengan angka ketebalan Endometrium pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai *correlation* yang positif. Menurut Arikunto (2010), nilai korelasi yang berada diantara 0,60 – 0,80 masuk dalam kategori korelasi cukup tinggi.

### 5.7 Analisis Regresi Linier Sederhana

Untuk selanjutnya dilakukan analisis regresi yang berguna untuk mendapatkan pengaruh variabel terhadap variabel. Dalam pengolahan data dengan menggunakan analisis regresi linier sederhana, dilakukan beberapa tahapan untuk mencari pengaruh antara variabel independen terhadap dependen. Berdasarkan hasil pengolahan data dengan menggunakan *software* SPSS 18. Pengujian model regresi ini digunakan untuk mengetahui apakah variabel independen memiliki pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen dengan hipotesis sebagai berikut:

$H_0$ : terdapat pengaruh yang tidak signifikan antara variabel X terhadap variabel Y;

$H_1$ : terdapat pengaruh yang signifikan antara variabel X terhadap variabel Y.

Kriteria Pengujian:

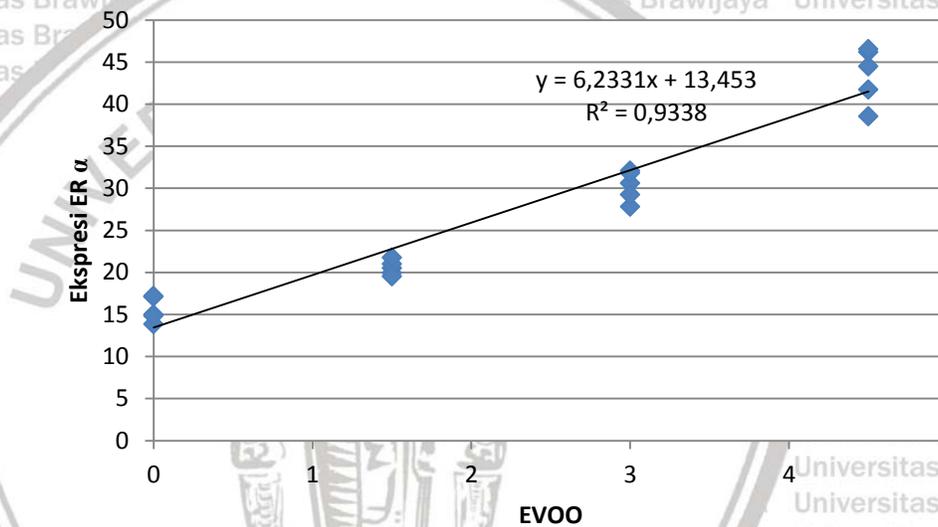
Jika nilai  $|t \text{ hitung}| > t \text{ tabel}$ , atau nilai signifikansi  $< 0,05$ , maka  $H_0$  ditolak.

Jika nilai  $|t \text{ hitung}| < t \text{ tabel}$ , atau nilai signifikansi  $> 0,05$ , maka  $H_0$  diterima.

5.7.1 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap Ekspresi ER  $\alpha$

Tabel 5.7 Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana

Variabel	B	t <sub>hitung</sub>	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	13,453			
EVOO	6,233	15,935	0,000	Signifikan
$\alpha$		= 0,05		
Koefisien Determinasi (R <sup>2</sup> )		= 0,9338		



Gambar 5.5 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap Ekspresi ER  $\alpha$

Berdasarkan Gambar 5.5 diatas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 13,453 + 6,233 X + e_i$$

Berdasarkan tabel 5.5 didapatkan bahwa variabel X (EVOO) memiliki statistik uji t sebesar 15,935 dengan signifikansi sebesar 0,000 Nilai signifikan t lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05). Pengujian ini menunjukkan bahwa  $H_0$  ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel X berpengaruh secara signifikan terhadap variabel Y.

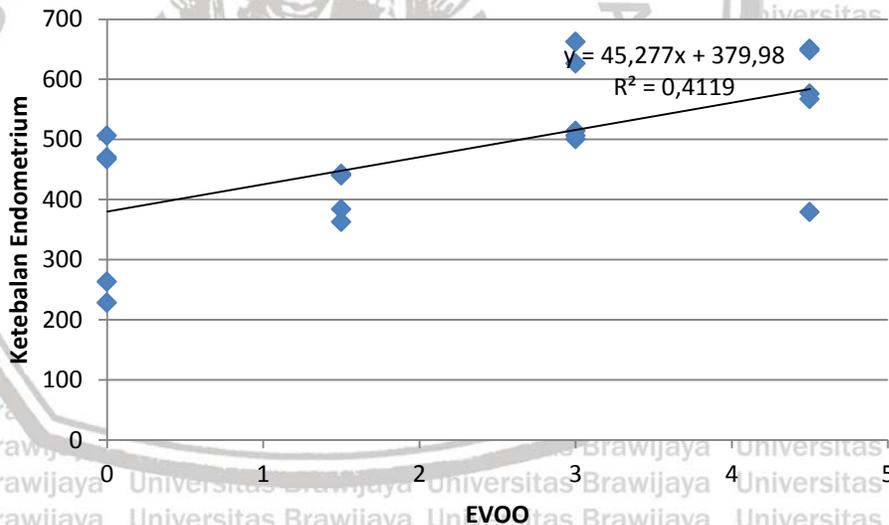
*Extra Virgin Olive Oil* berpengaruh positif dan signifikan terhadap Ekspresi ER  $\alpha$ .

Besarnya kontribusi dari variabel independen terhadap variabel dependen, berdasarkan hasil perhitungan pada tabel 5.7 dengan nilai koefisien determinasi (R Square) sebesar 0,915. Hasil tersebut menjelaskan kontribusi pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap ekspresi ER  $\alpha$  sebesar 91,5%.

**5.7.2 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap Ketebalan Endometrium.**

**Tabel 5.8 Ringkasan uji Regresi Linier Sederhana**

Variabel	B	t <sub>hitung</sub>	Signifikansi	Keterangan
Konstanta	379,982			
EVOO (X)	45,277	3,551	0,002	Signifikan
$\alpha$		= 0,05		
Koefisien Determinasi (R <sup>2</sup> )		= 0,4119		



**Gambar 5.6 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap Ketebalan Endometrium**

Berdasarkan gambar 5.6 di atas, diperoleh model regresi sebagai berikut :

$$Y = 379,982 + 45,277 X + e_i$$

Berdasarkan tabel 5.8 didapatkan bahwa variabel X (EVOO) memiliki

statistik uji t sebesar 3,551 dengan signifikansi sebesar 0,002. Nilai *signifikan* t lebih kecil dari  $\alpha$  (0,05). Pengujian ini menunjukkan bahwa  $H_0$  ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa variabel X berpengaruh secara signifikan terhadap variabel Y.

*Extra Virgin Olive Oil* berpengaruh positif dan signifikan terhadap ketebalan Endometrium.

Besarnya kontribusi dari variabel independen terhadap variabel dependen, berdasarkan hasil perhitungan pada Tabel 5.8 dengan nilai koefisien determinasi (R Square) sebesar 0,412. Hasil tersebut menjelaskan kontribusi pengaruh variabel EVOO terhadap variabel angka ketebalan Endometrium sebesar 41,2%.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pengaruh pemberian *Extra Virgin Olive Oil (EVOO)* terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen Alfa ( $ER \alpha$ ) pada *Rattus norvegicus* yang dipapar Rhodamin B.

Hasil penelitian terhadap  $ER \alpha$  dalam setiap perlakuan ditemukan perbedaan signifikan terhadap hasil rerata  $ER \alpha$  endometrium *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B selama 36 hari. Dalam penelitian ini, ekspresi  $ER \alpha$  tertinggi pada kelompok perlakuan 3 sebesar  $43,486 \pm 3,362$ , dan rata-rata angka ekspresi  $ER \alpha$  terendah pada perlakuan kelompok kontrol positif yaitu sebesar  $15,576 \pm 1,492$  yaitu kelompok yang diberikan rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari dan tidak diberikan *Extra Virgin Olive Oil*, dan berbeda signifikan dengan kelompok tikus yang tidak dipapar rhodamin B dan tidak diberikan EVOO, kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 1,5 ml/KgBB/hari, kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 3 ml/KgBB/hari, dan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 4,5 ml/KgBB/hari

Ekspresi  $ER \alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar Rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 4,5 ml/KgBB/hari memiliki ekspresi reseptor estrogen alfa yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok tikus yang tidak dipapar rhodamin B dan tidak diberikan *Extra Virgin Olive Oil*, kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari tanpa pemberian EVOO, kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari

+ EVOO 1,5 ml/KgBB/hari, dan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 3 ml/KgBB/hari.

Paparan rhodamin B pada *Rattus norvegicus* dengan dosis 18 mg/200 g BB menyebabkan terjadinya apoptosis jaringan di hipotalamus dan penurunan pada produksi FSH dan LH. Apoptosis hipotalamus terjadi karena adanya ketidakseimbangan rasio BAX (Bcl 2 Antagonist X/ pro apoptosis) dan BCL 2 (B cell lymphoma 2/ anti apoptosis). Kondisi ini dapat memodulasi terjadinya insufisiensi di hipotalamus, dimana hal tersebut menyebabkan penurunan sekresi GnRH sehingga mempengaruhi hipofisis anterior dalam mensekresi hormon gonadotrophin yang berperan pada proses steroidogenesis dan folikulogenesis. Penurunan dari aktivitas antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase dan catalase adalah indikasi kuat dari adanya stress oksidatif di otak (Sulistina, 2013).

Penurunan stimulasi estrogen menyebabkan penurunan jumlah reseptor estrogen serta berkurangnya afinitas pada endometrium. RE  $\alpha$  paling banyak terekspresi pada saluran reproduksi wanita yaitu pada uterus, ovarium, vagina, payudara, hipotalamus, sel endotel serta vascular otot polos. Fungsinya lebih banyak terdistribusi di jaringan penyusun organ reproduksi (Gruber, 2002). Uterus adalah organ reproduksi yang memiliki reseptor estrogen sehingga adanya perubahan yang terjadi pada lapisan penyusun dinding uterus adalah hasil dari regulasi hormone terutama hormone estradiol (Haibin, 2005).

Reseptor estrogen akan bersifat inaktif karena ketiadaan hormon estrogen pada endometrium. Reseptor estrogen menjadi aktif jika terdapat hormon estrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen di inti dalam jumlah yang optimal (Nikov et

al., 2000). Estrogen menembus permukaan sel kemudian masuk ke dalam sitoplasma dan berikatan dengan reseptor estrogen, kemudian sitoplasma membentuk ikatan hormone reseptor pada Estrogen Respon Element (ERE) dan bergerak ke inti sel untuk berikatan dengan DNA. Reseptor estrogen yang berikatan dengan DNA, memiliki peran pada proses transkripsi sel untuk membentuk protein yang diperlukan dalam pembelahan sel (Speroff & Fritz, 2005).

*Extra Virgin Olive Oil* mengandung flavonoid yang memiliki peran dalam scavenging radikal bebas. Aktivitas scavenging pada flavonoid diawali dengan pemberian gugus hidrogen atau electron terhadap radikal bebas yang kemudian menghasilkan molekul radikal flavonoid dan molekul stabil (RH). Radikal flavonoid mempunyai reaktifitas lebih rendah dibanding dengan radikal bebas. Kemudian radikal flavonoid berikatan dengan radikal lainnya menjadi senyawa non reaktif. Flavonoid adalah golongan fitoestrogen, yakni sumber estrogen yang berasal dari tanaman, merupakan senyawa non steroidal serta memiliki aktivitas esrogenik. Flavonoid bersifat estrogenik sehingga dapat menduduki reseptor estrogen yang berada dalam tubuh dan menimbulkan efek seperti estrogen (Satyaningtjas, 2014).

*Extra Virgin Olive Oil* mengandung polifenol yang tinggi. Turunan polifenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan electron yang dimiliki radikal bebas serta menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Polifenol merupakan komponen yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan pada sayur dan buah (Hattenschwiler dan Vitousek, 2000). Senyawa antioksidan mempunyai sifat relative stabil bentuk radikalnya. Senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan bisa diprediksi dari golongan alkaloid, fenolat, flavonoid yang merupakan senyawa polar.

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan senyawa atau ekstrak yang dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration* (IC 50), yaitu konsentrasi zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi maka mempunyai harga IC 50 yang rendah (Badarinath *et al.*, 2010).

Korelasi bermakna antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* dengan ekspresi RE  $\alpha$  menunjukkan hubungan positif yang signifikan dengan nilai signifikansi (0,000) lebih kecil dari 0,05. Dengan angka korelasi 0,969 termasuk hubungan yang tinggi.

Hal ini didasari oleh adanya kandungan antioksidan yang tinggi yang terdapat pada sediaan *Extra Virgin Olive Oil* yang digunakan pada penelitian ini. Hasil uji kadar antioksidan IC 50 di laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Universitas Brawijaya didapatkan hasil antioksidan IC 50 sebesar 48,56. Suatu senyawa dianggap memiliki kandungan antioksidan yang kuat jika nilai IC 50 kurang dari 50. Jadi semakin kecil nilai IC 50 maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Badarinath *et al.*, 2010).

*Extra Virgin Olive Oil* berpengaruh signifikan terhadap ekspresi RE  $\alpha$  dengan nilai signifikansi 0,000 lebih kecil dari 0,05. Koefisien yang positif artinya EVOO dapat meningkatkan ekspresi RE  $\alpha$  secara signifikan. Dengan besar kontribusi pengaruh EVOO terhadap ekspresi RE  $\alpha$  sebesar 93,4%.

Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* dapat meningkatkan rata-rata ekspresi RE  $\alpha$  pada tikus yang dipapar rhodamin B karena *Extra Virgin Olive Oil* mempunyai

aktivitas antioksidan yang sangat tinggi dengan kandungan polifenol, yang mempunyai peran melawan terhadap radikal bebas, juga sebagai co factor enzim antioksidan di dalam tubuh yaitu Catalase (CAT), Super Okside Dismutase (SOD), glutathione peroxide (GPx). *Extra Virgin Olive Oil* menghambat radikal bebas yang terjadi pada hipotalamus karena pemberian rhodamin B sehingga hipotalamus dapat berfungsi normal dalam mensekresi GnRH dan menyebabkan estrogen berikatan dengan reseptornya semakin meningkat.

## **6.2 Pengaruh pemberian Extra Virgin Olive Oil (EVOO) terhadap Ketebalan Endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar Rhodamin B.**

Kelompok tikus yang tidak dipapar rhodamin B dan tidak diberikan EVOO memiliki ketebalan endometrium yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari tanpa pemberian EVOO dan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 1,5 ml/KgBB/hari.

Sedangkan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari tanpa pemberian EVOO memiliki ketebalan endometrium yang paling rendah dan berbeda signifikan kelompok tikus yang tidak dipapar rhodamin B dan tidak diberikan EVOO, kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 3 ml/KgBB/hari, dan kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 g BB/hari + EVOO 4,5 ml/KgBB/hari.

Hal ini sejalan dengan penelitian Maryanti *et al* (2014) yang menyebutkan bahwa paparan rhodamin B selama 36 hari dengan dosis 18 Kg BB tikus bisa meningkatkan stress oksidatif yang berdampak terjadinya penurunan ketebalan endometrium.

*Extra Virgin olive Oil* berpengaruh signifikan terhadap ketebalan Endometrium dengan nilai signifikansi 0.002 lebih kecil dari 0,05. Koefisien yang positif artinya *Extra Virgin olive Oil* dapat meningkatkan ketebalan endometrium secara signifikan. Dengan besar kontribusi pengaruhnya terhadap ketebalan endometrium sebesar 41,2%. Estradiol yang diproduksi di ovarium melalui proses aromatase steroid oleh sel granulosa, sehingga peningkatan produksi estradiol juga diikuti oleh banyaknya folikel yang terbentuk. Pada fase pra ovulasi atau fase folikuler, konsentrasi FSH bersirkulasi rendah tetapi karena konsentrasi estrogen dan inhibin meningkat maka keduanya terus memberi umpan balik untuk menekan pelepasan FSH. Umpan balik negative dari estrogen menjaga LH tetap rendah, pada fase folikuler awal. Pada akhir fase folikuler, peningkatan konsentrasi estrogen mensensitisasi gonadotropin hipofisis terhadap GnRH yang menyebabkan terjadi lonjakan LH masih pra ovulasi dan memicu ovulasi serta proliferasi sel epitel dan sel stroma di endometrium (Guyton & Hall, 2007).

Besarnya kontribusi pengaruh EVOO terhadap ketebalan endometrium sebesar 41,2% tidak sebanding dengan kontribusi pengaruh EVOO terhadap ekspresi RE  $\alpha$  sebesar 93,4%. Angka ketebalan endometrium tidak dapat kembali sebagaimana ketebalan endometrium yang belum dipapar rhodamin B. Keadaan ini kemungkinan karena terdapat gangguan pada pembentukan korpus luteum yang akan mensekresikan hormon progesteron, hormone ini yang merangsang penebalan endometrium. Reseptor estrogen  $\alpha$  merupakan reseptor estrogen yang paling dominan di endometrium. Penurunan estrogen menyebabkan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  di endometrium juga menurun. Menurunnya ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  di endometrium akan mengganggu stimulasi sel epitel dan stroma endometrium

untuk berproliferasi, sehingga akan menurunkan ketebalan endometrium. Selain itu, ekspresi ER  $\alpha$  juga berhubungan dengan proliferasi sel dan karsinogenesis pada penyakit tumor dengan estrogen dependen. Saat akan terjadi implantasi, endometrium harus dalam keadaan siap dan matang yang ditandai dengan keadaan proliferasi dan diferensiasi seperti sekresi kelenjar, edema, proliferasi vaskuler dan desidualis. Menurunnya ekspresi ER  $\alpha$  di endometrium akan mengganggu stimulasi sel epitel dan stroma endometrium untuk berproliferasi, sehingga akan menurunkan ketebalan endometrium yang menyebabkan endometrium tidak siap sebagai tempat implantasi dan menyebabkan infertilitas. Perubahan ketebalan endometrium juga terjadi pada beberapa keadaan seperti menopause, pemakaian kontrasepsi, defek fase luteal, adanya patologi uterus yang menyebabkan hiperplasia endometrium dan adanya keganasan endometrium Putri (2007).

Endometrium adalah organ yang responsive terhadap perubahan hormon reproduksi yaitu estrogen dan berperan penting untuk proliferasi (Pupitadewi, 2007).

Adanya perubahan pada ukuran ketebalan endometrium adalah regulasi perubahan hormone estrogen. Tebal dinding endometrium yang berkurang akan mengganggu implantasi zigot sehingga memungkinkan terjadi infertilitas. Sebagaimana penelitian oleh Putri (2007) bahwa semain tipis endometrium maka akan memperkecil kehamilan yang berhubungan dengan fungsi endometrium dan ovarium.

Pertumbuhan endometrium terjadi akibat proliferasi epitel maupun elemen stroma yang dipengaruhi estrogen yang disekresi oleh ovarium. Stimulasi estrogen meningkatkan ukuran dan jumlah sel pada myometrium dan endometrium yang disertai dengan tahapan pembentukan reseptor estrogen yang spesifik dan proses sintesa protein (Mylonas *et al.*, 2005).

Estrogen yang diproduksi ovarium selama maturasi folikel, akan menstimulasi proliferasi kelenjar endometrium dan disebut fase proliferaatif. Estrogen membuat ovarium bersifat sekretorik sebagai persiapan konsepsi, menstimulasi sel epitel, stroma endometrium berproliferasi serta meningkatkan ketebalan endometrium (Sperrof dan Fritz, 2005; Guyton dan Hall, 2016).

Reseptor estrogen terdapat pada ovarium, uterus, pembuluh darah, vesika urinaria, otak, paru, tulang. RE  $\alpha$  banyak ditemukan di endometrium, jaringan hipotalamus dan stroma ovarium, payudara, uterus, jantung, hati dan ginjal (Gruber *et al.*, 2002). Dalam jaringan endometrium, RE  $\alpha$  merupakan mediator utama dari aksi estrogenik. Terjadi peningkatan progresif ketebalan endometrium pada fase folikuler. Pertumbuhan endometrium terjadi karena proliferasi epitel dan elemen stroma yang dipengaruhi oleh estradiol yang disekresi oleh ovarium (Gruber *et al.*, 2002).

Berdasarkan hasil uji Mann Withney terdapat perbedaan yang bermakna ketebalan endometrium pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang dipapar rhodamin B dan diberikan EVOO dengan dosis 3 ml/KgBB/hari, 4,5 ml/KgBB/hari. Hal ini berarti bahwa pemberian EVOO bisa meningkatkan ketebalan endometrium pada tikus yang dipapar rhodamin B. Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* dapat meningkatkan ketebalan endometrium karena salah satu fungsinya sebagai antioksidan sehingga dapat menunda proses oksidasi yang ada di endometrium. Senyawa *Extra Virgin Olive Oil* dapat menunda proses oksidasi karena kandungan phenol sebagai pemutus rantai ion radikal yang menyumbangkan hydrogen radikal pada hydrogen alkilperoksil yang dihasilkan oleh oksidasi lipid sehingga memiliki turunan yang lebih stabil. *Extra Virgin Olive Oil* juga dapat menurunkan ikatan

dengan logam dan meningkatkan enzim antioksidan endogenos serta meningkatkan transkripsi mRNA GPx sehingga bias meminimalisir terjadinya peningkatan ROS yang menyebabkan kerusakan pada endometrium.

Peran antioksidan secara umum yaitu menstimulasi sel teka interstisial, mengontrol pertumbuhan dan atresia folikel, merangsang steroidogenesis, memberikan rangsangan mekanis pada folikel ovarium. Folikel yang berkembang dapat menstimulasi pertumbuhan dinding endometrium (Ruder *et al.*, 2008). Pada saat praovulasi lonjakan dari GnRH sangat penting untuk reproduksi mamalia. Selama maturasi folikel, estrogen yang diproduksi ovarium akan menstimulasi proliferasi kelenjar endometrium dan disebut fase proliferaatif. Hormon estrogen membuat endometrium bersifat sekretorik sebagai persiapan konsepsi, menstimulasi sel epitel dan stroma endometrium berpoliferasi serta meningkatkan ketebalan endometrium (Speroff dan Fritz, 2005).

Korelasi antara *Extra Virgin olive Oil* dengan ketebalan endometrium menunjukkan hubungan positif yang signifikan dengan nilai signifikansi 0,005 lebih kecil dari 0,05. Dengan angka korelasi 0,605 termasuk hubungan yang cukup tinggi. Hubungan yang seiring antara pemberian *Extra Virgin olive Oil* dengan peningkatan ketebalan endometrium *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B disebabkan oleh kandungan *Extra Virgin olive Oil* yang bertindak sebagai antioksidan yang menetralsir oksidan berlebih di dalam tubuh yang bias merusak fungsi dari organ reproduksi. Peran sebagai antioksidan, ditandai dengan adanya peningkatan dari aktivitas total plasma antioksidan, GSH-Px dan GSH. Selain itu juga ditandai dengan penurunan oksidasi sel darah merah, gastrointestinal, renal, oksidasi LDL, ROS, GSSG (Cicerale *et al.*, 2012).



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
2. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) mampu meningkatkan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
3. Terdapat hubungan signifikan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ekspresi reseptor estrogen  $\alpha$  pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.
4. Terdapat hubungan signifikan antara pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) dengan ketebalan endometrium pada *Rattus norvegicus* yang dipapar rhodamin B.

#### 7.2 Saran

1. Disarankan untuk menghindari penggunaan rhodamin B dalam pengolahan makanan karena sifatnya yang toksik dan berdampak negatif terhadap organ reproduksi.
2. Disarankan kepada peneliti lain untuk meneliti pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap tuba fallopi yang dipapar rhodamin B

## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A., dan Allamaneni SS., 2004. Role of Free Radicals In Female Reproductive Diseases and Assisted Reproduction. *Reproductive Biomedicine*. 12: 731-46
- Agarwal A., Gupta S. dan Sikka S., 2006. The Role of Free Radicals and Antioxidants in Reproduction. *Obstetrics and Gynecology journals*, 18: 325-32.
- Agarwal A., Mellado AA., Premkumar BJ., Sharma A. dan Gupt S. 2012. The Effects of Oxidative Stress on Female Rproduction; a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, (10): 49.
- Akbar B., 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Ed 1, Adabia Press, Jakarta, p 1-47.
- Arikunto, Suharsimi. 2010. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek*. Jakarta: PT.Rineka Cipta
- Badarinath A., Rao K., Chetty CS., Ramkanth s., Rajan T., Gnanaprakash KA., 2010. Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2: 1276-1285
- BPOM, 2005. *Pedoman Pertolongan Keracunan Untuk Puskesmas. Bidang Informasi Keracunan Pusat Informasi Obat dan Makanan*. Badan POM RI, Jakarta.
- BPOM, 2005. *Pedoman Pertolongan Keracunan Untuk Puskesmas. Buku IV Bahan Tambahan Pangan Sentra Informasi Keracunan Nasional Pusat Informasi Obat dan Makanan*. Badan POM RI, Jakarta.
- BPOM, 2012. Bahaya Rhodaminn Pada Pangan. Dilihat 27 Juli 2017. <<http://ik.pom.go.id/v2012/wpcontent/uploads/2011/11Bahaya-Rhodamin-B-sebagai-Pewarna-pada-makanan.pdf>>.
- Chattopadhyay S., Ghosh SP., Ghosh D. dan Debnath J., 2003. Effect of Dietary Co-Administration of Sodium Selenite on Sodium Arsenite-Induced Ovarian and Uterine Disorders In Mature Albino Rats. *Toxicological Sciences*, 75: 470-5.
- Chatterjee A. dan Chatterji U., 2010. Arsenic Abrogates The Estrogen Signaling Pathway In The Rat Uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 8.
- Cicelare, S., Lucas, L.J., and Keast, R.S.J. 2010. Biological Activity of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Molecular Sciences*. 11: 458-479

Cooke PS., Selvaraj V., Yellayi S., 2006. Genistein, Estrogen Receptors and The Acquired Immune Response. *American Society for Nutrition*, 136: 704-708.

Cunningham FG., Giant NF., Leveno KJ., Gilstrap LC., Hauth JC., Wenstrom KD., 2005. *Obstetri Williams*. Twenty Second Edition, vol 1, McGraw Hill. Hal.13-15.

Danusanto H., 2003. Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Paru. *Jurnal Kedokteran Trisakti* 22(1).

Devasagayam TPA., 2004. Free Radicals and antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospect. *Assec Physicians India*, 5(2): 794-804

Dewi S., 2012. Farmakokinetik. Dilihat tanggal 14 Juli 2017. <<http://shintarosalia.lecture.ub.ac.id/files/2012/11/SRDtoxico2farmakokinetik1.pdf>>

Djarismawati, Sugiharti dan Nainggolan R, 2004. Pengetahuan dan Perilaku Pedagang Cabe Merah Giling Dalam Penggunaan Rhodamin B di Pasar Tradisional di DKI Jakarta. *Jurnal Ekologi Kesehatan*, 3(1): 7-12.

Eroschenko V., 2012. *Difiore's Atlas of Hystology with Functional Correlations*. Twelfth Edition. William and Wilkins. p 505-524.

Erwinanto, 2004. Hubungan Pertumbuhan Folikel, Kadar Estradiol dan Ketebalan Endometrium Hasil Induksi Ovulasi. Tesis Program Pendidikan Dokter Spesialis Obstetri Ginekologi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Febrina RGAA., Wiratmini NI., Sudarti NW., 2013. Pengaruh Pemberian Rhodamin B Terhadap Siklus Estrus Mencit (Mus Musculus L) Betina. *Jurnal Biologi*, XVII(1): 21-23.

Fehri B., Aiache JM., Mrad S., Korbi S. dan Lamaison JL., 1996. Olea Europea L: Stimulant, anti-ulcer, anti-inflammatory effects. *Boll.Chim.Pharm*, 135(1): 42-49.

Fito,M., Torre, D.R., Albaladejo, M.F., Khymenez, O., Marrugat, J., and Covas, M.I. 2007. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4):375-381

Ganong WF., 1998. Fisiologi Kedokteran. Edisi ke 16, Widjajakusuma MD., EGC, Jakarta.

Ganong WF., 2010. Review of Medical Physiology. Twenty Third Edition. Mc Graw Hill. P 412-418

Gruber J., Tachuguel., Schneberger C., Hubber J., 2002. Production and Action of Estrogen. *The New England Journal of Medicine*. 346(5): 340-348

Guyton AC., dan Hall JE., 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.

Haibin W., Sussane X., Hulriong H., Gregory KD., Sanjoy., Sudhansu., 2005. *Variationnin Commercial Rodent Diets Induces Disparate Molecular and Physiological Changes in The Uterus*. PNAS 28 (102) : 9960-9965.

Hanafiah KA., 2012. *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Edisi Ketiga, Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Halliwell B. dan Gutteridge JMC, 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Four Edition, Oxford University Press Inc, Oxford.

Heim KE., Tagliaferro AR., Bobilya DJ., 2002. Flavonoid antioxidant: Chemistry, Metabolism and Structure –Activity Realtionship, *Nutr Biochem*, 13(10): 572-584.

Hewitt SC., Harrel JC., Korach KS., 2005. Lesson in Estrogen Biology From Knockout and Transgenic Animals. *The Annual Review of Physiology*. 67: 286.

Imidayanti Y., 2012. Effect of Retinoic Acid on Fetus Reproductive Organ Mice (Mus musculus) Swiss Webster. *World Academic Science, Engineering and Technology*, 6(4).

Johnson, 2005. Olive Oil. *Nature International Weekly Journal of Science: Arthritis Today*.

Junquera LC. Dan Carneiro J., 2007. *Basic Histology: Text and Atlas*. EGC, Jakarta, p 412-418.

Kinanthi, 2009. Minyak Zaitun Sumber Lemak Nabati, Dilihat tanggal 19 Juli 2017, <http://kinanthidiah.multiply.com/journal/item/4>.

Kouka, P., Priftis A., Stagos D., Angelis A., Stathopoulos P., Xinos N., et al, 2017. Assesment of The Antioxidant Activity of an Olive Oil Total Polyphenolic Fraction and Hydroxytyrosol from a Greek Olea Europea Variety in Endothelial Cells and Myoblast. *International Journal Of Molecular Medicine*, 40: 703-712

Marcondes FK., Bianchi FJ., Tanno AP., 2002. Determination of Estrus Cycle Phase of Rats: Some Helpful Consideration Brazilia. *Journal of Biology*, 62(4A): 611-613.

- Maryanti S., Suciati S., Wahyuni ES., Santoso S., Wiyasa IWA., 2014. Rhodamin B Triggers Ovarian Toxicity Through Oxidative Stress. *Cukurova Medical Journal*, 39(3): 451-457
- Meilina, 2017. Extra Virgin Olive Oil Menurunkan Kadar MDA pada Tikus Wistar Yang Dipapar Asap Rokok. *Intisari Sains Medis*, 8(2): 97-101
- Muchtadi D., 2012. *Pangan Fungsional dan Senyawa Bioaktif*. Alfabeta. Bandung.
- Muchtadi D., 2013. *Antioksidan dan Kiat Sehat Di Usia Reproduksi*. Alfabeta, Bandung.
- Mukono HJ., 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Musahilah T., 2010. *Efek Pemberian Ekstrak Daun Maja (Aegle Marmelos Corr) Terhadap Fertilitas Tikus Betina*. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nilson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., et al, 2001. *Mechanism of Estrogen Action*. *Physiological Reviews*, 81(4): 1535-1565.
- Nugraheni K., 2012. Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nursyah DA., 2012. *Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Ovariectomi Yang Diberi Tepung Daging Teripang (Holothuria Scabra)*. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.
- Orey C., 2008. *Khasiat Minyak Zaitun; Resep Umur Panjang Ala Mediterania*, Hikmah, Jakarta.
- Permatasari A., Susantiningih dan Kurniawati E., 2014. Identifikasi Zat Pewarna Rhodamin B Dalam Jajanan Yang Dipasarkan Di Pasar Tradisional Kota Bandar Lampung. Dilihat tanggal 26 Agustus 2017. <[juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/download/285/283](http://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/download/285/283)>
- Puspitadewi S. dan Sunarno, 2007. Potensi Agensi Anti Fertilitas Biji Tanaman Jarak (*Jatropha Curcas*) dalam Mempengaruhi Profil Uterus Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster. *Jurnal Sains dan Matematika*, 15: 55-60.
- Putri R., 2007. Struktur Mikroanatomi Uterus Mencit (*Mus musculus*) Galur Swiss setelah Pemberian ekstrak Kulit Batang Durian (*Durio Zibethinus Murr*). Skripsi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru.

Rahmawati M., 2008. Bahaya Pewarna Tekstil Dalam Makanan. Dilihat tanggal 10 Juli 2017. <<http://id.scribd.com/doc/203397533/Artikel-Hendi-Rahman-09310144-1>>

Rajendran D., Murugan S., Subbulakshmi P., Saravanan R., 2013. Antioxidant in Periodontal Disease. *Earthjournal*, 2(2) : ISSN 2319-1082.

Ruder E., Hartman T. dan Blumberg J., 2008. Oxidative Strees And Antioxidants: Expossure and Impact on Female Fertility. *Human Reproduction Update*, 14(4): 345-57.

Setiawan AM., 2012. Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Dosis Kronis Secara Oral Terhadap Peningkatan Penanda Kerusakan Organ Pada Mencit. *El Hayah*, 3(1).

Subandi, 1999. Penentuan Kadar Arsen dan Timbal Dalam Pewarna Rhodamin B dan Auramin Secara Spektrofotometri: Suatu penelitian pendahuluan. *Jurnal Matematika, Ilmu Pengetahuan Alam dan pembelajarannya* 28 (1).

Sperrof L., Fritz MA., 2005. *Female Infertility in Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*. Seventh Edition, PA: Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Edisi 6, p 52-66.

Sperrof L., Fritz MA., 2011. *Female Infertility in Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*.. Eighth Edition Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia. p 749-857.

Sulistina D., 2013. *Pengaruh Rhodamin B Terhadap Ekspresi BAX (Bcl-2 Antagonist X) dan BCL-2 (B-cell lymphoma-2) Hypothalamus, FSH (Follicle Stimulating Hormone) dan LH (Luteinizing Hormone) Pada Rattus Norvegicus*. Universitas Brawijaya.

Sulistina D., Ratnawati R., Wiyasa I., 2014. Rhodamin B Increases Hypotalamic Cell Apoptosis and Disrupts Hormonal Balance in Rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(3): 180-183

Ujiani S. dan Rahayu P., 2012. Analisis Resiko Rhodamin B Dalam Terasi Terhadap Kesehatan Masyarakat. *Jurnal Kesehatan*, 3(2): 197-203.

Utami W. dan Suhendi A., 2009. Analisis Rhodamin B dalam Jajanan Pasar Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 2(10): 148-155.

Vidyasatya dan Cityca, 2011. *Rhodamin dan Pewarna Makanan Berbahaya*, dilihat 19 Agustus 2017, <<http://apotekerbercerita.wordpress.com/2011/07/02/rhodamin-dan-pewarna-makanan-berbahaya>>.

Weihua Z., Saji S., Makinen S., Cheng G., Jensen EV., Warnwe M., et al. 2000. Estrogen Receptor (ER)  $\beta$ , a modulator of ER  $\alpha$  in uterus. *PNAS*, 97: 5936-5941

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

Zainudin M., 2011. *Metodologi Penelitian Kefarmasian dan Kesehatan*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Zarate S., Zaldivar V., Jaita G., Magri L., Radl D., et al. 2010. The role of estrogens in anterior pituitary gland remodeling during the estrous cycle. *Front Horm Res*, 38: 25–31





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. 45 / EC / KEPK – S2 / 03 / 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 *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) terhadap Infertilitas akibat Paparan Rhodamin B pada *Rattus norvegicus*.

**PENELITI UTAMA** : Siti Anisak  
Huda Rohmawati  
Fera Yuli Setyaningsih  
Ita Noviasari

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

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi, Sentral Biomedik, dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang  
Ketua



Prof. Dr. dr. Moch Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.  
NIK. 160746633

**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 (Amendemen Protokol).

LAMPIRAN 2



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 : 400 /UN10.F08.08/PN/2018

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

- Judul : Pengaruh Pemberian *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) Terhadap Ekspresi Reseptor Estrogen  $\alpha$  Dan Ketebalan Endometrium Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Rhodamin B
- Penulis : Ita Noviasari
- NIM : 166070400111032
- Jumlah Halaman : 77
- Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Kebidanan)
- Kemiripan : 3 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

20 JUL 2018



Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

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



LAMPIRAN 3



JURNAL NERS DAN KEBIDANAN (JOURNAL OF NERS AND MIDWIFERY)  
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN PATRIA HUSADA BLITAR  
Alamat: Jl. Sudanco Supriyadi 168 Blitar  
Telp/ Fax: 0342-814086  
Email: jnkphb@gmail.com  
p-ISSN: 2355-052X e-ISSN: 2548-3811

TANDA TERIMA MANUSKRIP JURNAL

Hormat kami,

Dengan adanya pemberitahuan ini kami Tim Editor JNK "Jurnal Ners dan Kebidanan" menyatakan bahwa manuskript berikut:

- Judul Penelitian : PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL (EVOO) TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR ESTROGEN  $\alpha$  DAN KETEBALAN ENDOMETRIUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR RHODAMIN B
- Peneliti : Ita Noviasari
- Asal Institusi : STIKes Patria Husada Blitar
- Rencana Penerbitan Pada : Jurnal Ners dan Kebidanan, Volume 5 Nomor 3
- Bulan Diterima : Juli 2018
- Bulan Penerbitan : Desember 2018

Kami **terima** untuk diterbitkan di Jurnal kami "Jurnal Ners dan Kebidanan" pada waktu tersebut diatas,

Demikian pemberitahuan dari kami, atas perhatiannya kami ucapkan terimakasih.

Blitar, 20 Juli 2018

Penerima

Erni Setiyorini, M.Kep

NIK.180906016



LAMPIRAN 4



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 : Ita Noviasari

NIM : 16607040011032

Program Studi : Magister Kebidanan FKUB

Judul Penelitian : Pengaruh Pemberian Ekstrak Virgin Olive Oil Terhadap Ekspresi Reseptor Alfa  
Dan Ketebalan Endometrium Pada *Rattus Norvegicus* Yang Dipapar  
Rhodamin B.

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



5 Juli 2018

ab. Patologi Anatomi FKUB

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



LAMPIRAN 5

Data Hasil Pemeriksaan ER  $\alpha$  dan ketebalan Endometrium

No	Kelompok	Ekspresi ER Alpha %	Ketebalan Endometrium $\mu\text{m}$
1	KN	37.68	991.012
2	KN	38.78	414.598
3	KN	39.39	814.622
4	KN	37.54	656.825
5	KN	37.36	558.955
6	KP	17.1	470.21
7	KP	17.18	228.406
8	KP	14.96	467.29
9	KP	13.83	506.226
10	KP	14.81	263.181
11	P1	20.5	440.135
12	P1	19.92	362.682
13	P1	21.01	442.33
14	P1	19.53	442.079
15	P1	21.74	384.111
16	P2	27.8	514.108
17	P2	32.09	626.585
18	P2	30.6	662.391
19	P2	29.25	500.13
20	P2	31.79	505.96
21	P3	44.47	650.927
22	P3	46.18	379.367
23	P3	46.54	647.996
24	P3	38.54	575.936
25	P3	41.7	567.075

LAMPIRAN 6

Output SPSS one way anova.

Uji normalitas data

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi ER Alpha	.167	25	.070	.921	25	.053
Ketebalan Endometrium	.121	25	.200 <sup>*</sup>	.949	25	.240

a. Lilliefors Significance Correction

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

Uji homogenitas ragam data

	Test of Homogeneity of Variances			
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi ER Alpha	4.745	4	20	.007
Ketebalan Endometrium	3.605	4	20	.023

Deskriptif

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Ekspresi ER Alpha	Kontrol	5	38.1500	.88764	.39696	37.0479	39.2521	37.36	39.39
	Negatif								
	Kontrol	5	15.5760	1.49249	.66746	13.7228	17.4292	13.83	17.18
	Positif								
	P1	5	20.5400	.87564	.39160	19.4527	21.6273	19.53	21.74
	P2	5	30.3060	1.79350	.80208	28.0791	32.5329	27.80	32.09
	P3	5	43.4860	3.36175	1.50342	39.3118	47.6602	38.54	46.54
Total	25	29.6116	10.79948	2.15990	25.1538	34.0694	13.83	46.54	
Ketebalan Endometrium	Kontrol	5	687.2024	223.72939	100.05483	409.4057	964.9991	414.60	991.01
	Negatif								
	Kontrol	5	387.0626	130.44962	58.33884	225.0880	549.0372	228.41	506.23
	Positif								

P1	5	414.2674	38.08080	17.03025	366.9838	461.5510	362.68	442.33
P2	5	561.8350	76.66710	34.28657	466.6402	657.0298	500.13	662.39
P3	5	564.2602	110.51308	49.42295	427.0401	701.4803	379.37	650.93
Total	25	522.9255	164.42145	32.88429	455.0557	590.7954	228.41	991.01

**Uji kruskal wallis**

**Kruskal-Wallis Test**

Ranks			
	Dosis	N	Mean Rank
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Negatif	5	18.40
	Kontrol Positif	5	3.00
	P1	5	8.00
	P2	5	13.00
	P3	5	22.60
	Total		25
Ketebalan Endometrium	Kontrol Negatif	5	18.60
	Kontrol Positif	5	7.60
	P1	5	6.40
	P2	5	16.40
	P3	5	16.00
	Total		25

Test Statistics <sup>a,b</sup>		
	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium
Chi-square	22.737	11.505
df	4	4
Asymp. Sig.	.000	.021

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dosis

**Uji lanjut dengan mann whitney**

**Mann-Whitney Test**

Ranks

Dosis		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Negatif	5	8.00	40.00
	Kontrol Positif	5	3.00	15.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Negatif	5	7.40	37.00
	Kontrol Positif	5	3.60	18.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium
Mann-Whitney U	.000	3.000
Wilcoxon W	15.000	18.000
Z	-2.611	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.056 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

**Mann-Whitney Test**

**Ranks**

Dosis		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Negatif	5	8.00	40.00
	P1	5	3.00	15.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Negatif	5	7.40	37.00
	P1	5	3.60	18.00
	Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium
Mann-Whitney U	.000	3.000
Wilcoxon W	15.000	18.000
Z	-2.611	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.047



Exact Sig. [2\*(1-tailed Sig.)] .008<sup>a</sup> .056<sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis



### Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Negatif	5	8.00	40.00
	P2	5	3.00	15.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Negatif	5	6.40	32.00
	P2	5	4.60	23.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>b</sup>			
	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium	
Mann-Whitney U	.000	8.000	
Wilcoxon W	15.000	23.000	
Z	-2.611	-.940	
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.347	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.421 <sup>a</sup>	

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Negatif	5	3.40	17.00
	P3	5	7.60	38.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Negatif	5	6.40	32.00
	P3	5	4.60	23.00
	Total	10		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Ketebalan	
	Ekspresi ER Alpha	Endometrium
Mann-Whitney U	2.000	8.000
Wilcoxon W	17.000	23.000
Z	-2.193	-.940
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028	.347
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 <sup>a</sup>	.421 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

Ranks

		Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Positif		5	3.00	15.00
	P1		5	8.00	40.00
	Total		10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Positif		5	6.00	30.00
	P1		5	5.00	25.00
	Total		10		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Ketebalan	
	Ekspresi ER Alpha	Endometrium
Mann-Whitney U	.000	10.000
Wilcoxon W	15.000	25.000
Z	-2.611	-.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.690 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Positif	5	3.00	15.00
	P2	5	8.00	40.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Positif	5	3.40	17.00
	P2	5	7.60	38.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>b</sup>		
	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium
Mann-Whitney U	.000	2.000
Wilcoxon W	15.000	17.000
Z	-2.611	-2.193
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.032 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

		Ranks		
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	Kontrol Positif	5	3.00	15.00
	P3	5	8.00	40.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	Kontrol Positif	5	3.60	18.00
	P3	5	7.40	37.00
	Total	10		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Ketebalan Endometrium	
	Ekspresi ER Alpha	
Mann-Whitney U	.000	3.000
Wilcoxon W	15.000	18.000
Z	-2.611	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.056 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

Ranks

	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	P1	5	3.00	15.00
	P2	5	8.00	40.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	P1	5	3.00	15.00
	P2	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Ketebalan Endometrium	
	Ekspresi ER Alpha	
Mann-Whitney U	.000	.000
Wilcoxon W	15.000	15.000
Z	-2.611	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.008 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis



### Mann-Whitney Test

Ranks				
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	P1	5	3.00	15.00
	P3	5	8.00	40.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	P1	5	3.80	19.00
	P3	5	7.20	36.00
	Total	10		

Test Statistics <sup>b</sup>			
	Ekspresi ER Alpha	Ketebalan Endometrium	
Mann-Whitney U	.000	4.000	
Wilcoxon W	15.000	19.000	
Z	-2.611	-1.776	
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.076	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.095 <sup>a</sup>	

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis

### Mann-Whitney Test

Ranks				
	Dosis	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi ER Alpha	P2	5	3.00	15.00
	P3	5	8.00	40.00
	Total	10		
Ketebalan Endometrium	P2	5	5.20	26.00
	P3	5	5.80	29.00
	Total	10		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Ketebalan Endometrium	
	Ekspresi ER Alpha	Endometrium
Mann-Whitney U	.000	11.000
Wilcoxon W	15.000	26.000
Z	-2.611	-.313
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.754
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 <sup>a</sup>	.841 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Dosis



**Output SPSS Uji Hubungan Uji normalitas**

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
dosis	.169	20	.139	.863	20	.009
Ekspresi ER Alpha	.197	20	.040	.900	20	.041
Ketebalan Endometrium	.116	20	.200*	.958	20	.504

a. Lilliefors Significance Correction

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

**Uji hubungan dosis dengan ekspresi ER alpha**

**Nonparametric Correlations**

**Correlations**

			dosis	Ekspresi ER Alpha
Spearman's rho	dosis	Correlation Coefficient	1.000	.969**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	20	20
	Ekspresi ER Alpha	Correlation Coefficient	.969**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	20	20

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

**Uji hubungan dosis dengan ketebalan Endometrium**

**Nonparametric Correlations**

**Correlations**

			dosis	Ketebalan Endometrium
Spearman's rho	dosis	Correlation Coefficient	1.000	.605**
		Sig. (2-tailed)	.	.005
		N	20	20
	Ketebalan Endometrium	Correlation Coefficient	.605**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.005	.
		N	20	20

Correlations

			dosis	Ketebalan Endometrium
Spearman's rho	dosis	Correlation Coefficient	1.000	.605**
		Sig. (2-tailed)	.	.005
		N	20	20
	Ketebalan Endometrium	Correlation Coefficient	.605**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.005	.
		N	20	20

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

Tambahan

Menurut Arikunto (2010), interpretasi nilai korelasi adalah sebagai berikut :

Interpretasi Nilai Korelasi

Besarnya Korelasi	Interpretasi
0.80 sampai dengan 1.00	Tinggi
0.60 sampai dengan 0.80	Cukup
0.40 sampai dengan 0.60	Agak rendah
0.20 sampai dengan 0.40	Rendah
0.00 sampai dengan 0.20	Sangat rendah

Arikunto, Suharsimi . 2010. Metode Penelitian Ekonomi. UI Press. Jakarta.

## Output SPSS uji analisis pengaruh.

### Regression

**Descriptive Statistics**

	Mean	Std. Deviation	N
Ekspresi ER Alpha	27.4770	11.09833	20
dosis	2.2500	1.72062	20

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dosis <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Ekspresi ER Alpha

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.966 <sup>a</sup>	.934	.930	2.93361

a. Predictors: (Constant), dosis

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2185.376	1	2185.376	253.934	.000 <sup>a</sup>
	Residual	154.909	18	8.606		
	Total	2340.285	19			

a. Predictors: (Constant), dosis

b. Dependent Variable: Ekspresi ER Alpha

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	13.453	1.098		12.256	.000
	dosis	6.233	.391	.966	15.935	.000

a. Dependent Variable: Ekspresi ER Alpha

## Regression

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Ketebalan Endometrium	481.8563	121.38205	20
dosis	2.2500	1.72062	20

Variables Entered/Removed<sup>b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dosis <sup>a</sup>		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Ketebalan Endometrium

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.642 <sup>a</sup>	.412	.379	95.63348

a. Predictors: (Constant), dosis

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	115314.705	1	115314.705	12.609	.002 <sup>a</sup>
	Residual	164623.714	18	9145.762		
	Total	279938.419	19			

a. Predictors: (Constant), dosis

b. Dependent Variable: Ketebalan Endometrium

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
		1	(Constant)	379.982		
	dosis	45.277	12.751	.642	3.551	.002

a. Dependent Variable: Ketebalan Endometrium

**RIWAYAT HIDUP**

Ita Noviasari, lahir di Blitar, 4 November 1985 anak pertama dari dua bersaudara, putri dari Bapak Suherman dan Ibu Siti Romelah.

Lulus SD Negeri 3 Sumberjo tahun 1998, lulus SLTP Negeri 1

Blitar tahun 2001, dan lulus SMU Negeri 1 Blitar tahun 2004.

Tahun 2004 melanjutkan pendidikan D III Kebidanan di Poltekkes

Kemenkes Malang Program Studi Kebidanan Kediri, lulus tahun

2007. Melanjutkan DIV Bidan Pendidik di Poltekkes Kemenkes

Malang, lulus tahun 2010. Pada tahun 2016 penulis mengambil pendidikan

Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Tahun 2007 penulis bekerja di RSUD Aminah Blitar. Tahun 2008 sampai dengan sekarang bekerja sebagai staf pendidikan di STIKes Patria Husada Blitar.

