

**PENGARUH EKSTRAK AIR DAUN KELOR
(*Moringa oleifera* Lamk) TERHADAP KADAR SOD
DAN INDEKS APOPTOSIS ENDOMETRIUM
TIKUS WISTAR YANG DIPAPAR *DEPO*
*MEDROXYPROGESTERONE ACETATE***

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister



OLEH :

NAILI RAHMAWATI

156070400111005

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS
BRAWIJAYA
MALANG
2017**

TESIS

PENGARUH EKSTRAK AIR DAUN KELOR (*Moringa oleifera* Lamk) TERHADAP KADAR SOD DAN INDEKS APOPTOSIS ENDOMETRIUM TIKUS WISTAR YANG DIPAPAR *DEPO* *MEDROXYPROGESTERONE ACETATE*

Oleh :
NAILI RAHMAWATI
156070400111005

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 21 Agustus 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING

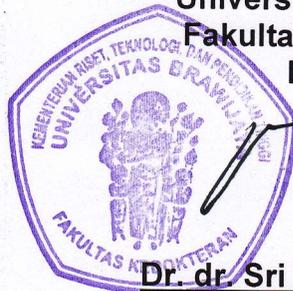

Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K)
NIP. 195706301984121001

Ketua


Dr. Dra. Sri Winarsih, Msi., Apt
NIP. 195408231981032001

Anggota

Malang, 29 AUG 2017
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



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

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK AIR DAUN KELOR
(*Moringa oleifera* Lamk) TERHADAP KADAR SOD DAN
INDEKS APOPTOSIS ENDOMETRIUM
TIKUS WISTAR YANG DIPAPAR DEPO
MEDROXYPROGESTERONE ACETATE**

Oleh :
NAILI RAHMAWATI
156070400111005

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 21 Agustus 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K)
NIP. 195706301984121001

Ketua

Dr. Dra. Sri Winarsih, Msi., Apt
NIP. 195408231981032001

Anggota Penguji

Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes
NIP. 195210271981032001

Anggota Penguji

Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K)
NIP. 196902041999031008

Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

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

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

Malang, 21 Agustus 2017

Mahasiswa,



Nama : Naili Rahmawati
NIM : 156070400111005
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB

HALAMAN PERUNTUKAN

Karya ilmiah ini kutujukan kepada
Ayahanda dan almarhumah ibunda terkasih
Suamiku tercinta Indra Karana, dan Putraku tersayang Djati

RINGKASAN

Naili Rahmawati

Pengaruh ekstrak air daun kelor (*moringa oleifera lamk*) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium tikus wistar yang dipapar depo medroxyprogesterone acetate. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing : Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG; Anggota : Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt.

DMPA adalah kontrasepsi hormonal yang paling sering digunakan dan memiliki efektivitas yang tinggi. Mekanisme kerja DMPA adalah menekan produksi hormon estrogen dengan menurunkan sekresi GnRH (gonadotropin releasing hormone). Estrogen mempunyai kemampuan sebagai antioksidan yaitu upregulator ekspresi gen enzim antioksidan, terutama enzim superoksida dismutase (SOD) didalam mitokondria. DMPA dapat menurunkan kadar SOD ovarium dan menyebabkan apoptosis pada sel endometrium. Kelor (*moringa oleifera Lamk*) memiliki kandungan zat antioksidan yaitu polifenol yang dapat mencegah kerusakan akibat radikal bebas dan mencegah reaksi berantai peroksida lipid pada membran sel.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak air daun kelor (*moringa oleifera Lamk*) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah true experimental dengan pendekatan post test only control group design. Sampel yang digunakan adalah Tikus Wistar berjumlah 25 tikus, terbagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (diinjeksi aquabides 0,2 ml dan diberi aquabides secara oral sebanyak 1 cc), kelompok kontrol positif (Dipapar DMPA 2,7 mg dan diberi aquabides secara oral), kelompok perlakuan 1 (DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis 100 mg/kg BB), Kelompok perlakuan 2 (DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis 150 mg/kg BB), Kelompok perlakuan 3 (DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis 200 mg/kg BB). Tikus diadaptasi selama 7 hari dan diberi perlakuan selama 28 hari. Pengukuran kadar SOD menggunakan metode Colorimetry, sedangkan pengukuran indeks apoptosis dengan metode Immunohistokimia. Data hasil pengamatan dianalisis dengan uji Anova One Way, Uji LSD dan Uji Pearson Product Moment.

Berdasarkan pada hasil analisis kadar SOD uterus dengan menggunakan uji Anova One Way dan Uji Pearson Product Moment diperoleh hasil p-value > 0,05, artinya secara statistik tidak ada pengaruh ekstrak air daun kelor dalam berbagai dosis terhadap kadar SOD uterus tikus wistar, namun secara deskriptif kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan peningkatan kadar SOD. Penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan dan hubungan yang signifikan pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor terhadap indeks apoptosis endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA dan terdapat hubungan yang signifikan antara kadar SOD uterus dengan indeks apoptosis tikus wistar yang dipapar DMPA.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak air daun kelor tidak berpengaruh pada kadar SOD uterus tikus wistar yang dipapar DMPA namun berpengaruh pada indeks apoptosis endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA dan ada hubungan antara kadar SOD uterus dengan indeks apoptosis endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA

SUMMARY

Naili Rahmawati

The influence of the water extract of moringa oleifera Lamk on superoksida dismutase level and endometrium indeks apoptosis of wistar wats treated by depo medroxyprogesterone acetate. Master of Midwifery Program of Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Chairman of Supervisor Commission : Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K), Members: Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt.

DMPA is a hormonal contraceptive that most often used and has a high level of effectiveness. Mechanism of action of DMPA that suppress the production of estrogen by lowering GnRH (gonadotropin releasing hormone). Estrogen has the ability as a powerful antioksidan as upregulator gene expression of antioxidant enzymes, especially enzymes superoxide dismutase (SOD) in the mitokondria. DMPA can decrease SOD level ovarium and causes endometrium cell apoptosis. Moringa oleifera Lamk contains antioxidant is polifenol that prevent free radical damage and prevent the chain reaction of lipid peroxidation in cell membranes.

This research aimed to understand the influence of the water extract of moringa oleifera Lamk on superoksida dismutase level and indeks apoptosis endometrium of wistar rats treated by depo medroxyprogesterone acetate.

Research's design used true experimental with a posttest only control group design approach. The sample used Wistar Rats amounted to 25, divided into 5 groups. Negative control group distilled water injection 0,2 ml and distilled water oral 1 cc, positive control (exposed to 2,7 mg DMPA and distilled water oral 1 cc), the first treatment group (DMPA and moringa oleifera Lamk water extract 100 mg/kg BW), group 2 (DMPA and moringa oleifera Lamk water extract 150 mg/kg BW), group 3 (DMPA and moringa oleifera Lamk water extract 200 mg/kg BW). Rats adapted for 7 days and were treated for 28 days. SOD level was measured with colormetry method whereas indeks apoptosis was measured with immunohistochemistry method. Data of the observation result were analyzed using Anova One Way Test, LSD Test and Pearson Product Moment Test.

Based on the result of the analysis of uterus SOD level by using Anova One Way test dan Pearson Product Moment test found the result of p-value > 0,05, meaning that statistically there no influential of moringa oleifera Lamk water extract in various dosage in the uterus SOD level, but descriptively show that group 1 and group 3 the uterus SOD level to rise. The Study show significant different and significant relationship in endometrium indeks apoptosis rats wistar were treated by DMPA and show significant relationship in uterus SOD level with endometrium indeks apoptosis rats wistar were treated by DMPA.

The study concluded that administration of Moringa oleifera Lamk water extract no influence on uterus SOD level, but influence on endometrium indeks apoptosis rats wistar were treated by DMPA and show relationship in uterus SOD level with endometrium indeks apoptosis rats wistar were treated by DMPA

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul : Pengaruh Ekstrak Air Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap Kadar SOD dan Indeks Apoptosis Endometrium Tikus Wistar yang dipapar Depo Medroxyprogesterone Acetate.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi Depo Medroxyprogesterone Acetate, radikal bebas, antioksidan, apoptosis, kelor.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS 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. 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.
3. Dr. dr. Bambang Rahardjo, SpOG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

sekaligus selaku Penguji II yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.

4. Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K) selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. Dra. Sri Winarsih, MSi., Apt. selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes selaku Penguji I yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
6. Seluruh dosen dan staf akademik khususnya di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan yang telah diberikan.
7. Segenap keluarga termasuk ayahanda, almarhumah Ibu, suami, putra, rekan-rekan tim penelitian, rekan-rekan mahasiswa Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan rekan-rekan sejawat yang selalu memberikan dukungan, motivasi, perhatian dan doanya selama proses studi.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	vi
RINGKASAN	vi
SUMMARY	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Akademik.....	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 DMPA	7
2.1.1 Pengertian dan Klasifikasi	7
2.1.2 Mekanisme Kerja.....	7
2.1.3 Farmakokinetik	9
2.1.4 Farmakodinamik	11
2.1.5 Efektifitas.....	13
2.1.6 Keuntungan dan Keterbatasan	13
2.1.7 Efeksamping.....	14
2.1.8 Hubungan DMPA dengan Estrogen dan reseptor Estrogen.....	16
2.1.9 Fisiologi dan Pengaruh DMPA pada Endometrium.....	17
2.2 Radikal Bebas.....	24
2.2.1 Definisi	24
2.2.2 Tahapan Reaksi Pembentukan Radikal Bebas.....	24

2.2.3	Mekanisme Kerja dan Dampak Radikal Bebas	24
2.2.4	Efek Radikal Bebas (ROS/RNS) terhadap Stres Oksidatif	24
2.3	Antioksidan.....	25
2.3.1	Definisi Antioksidan	25
2.3.2	Mekanisme Kerja Antioksidan.....	25
2.3.3	Jenis-Jenis Antioksidan	26
2.4	Apoptosis.....	29
2.4.1	Pengertian.....	29
2.4.2	Fisiologi dan Patologis Apoptosis	29
2.4.3	Proses Apoptosis.....	30
2.4.4	Pemeriksaan Apoptosis.....	31
2.4.5	Cara Mengukur Apoptosis	32
2.5	Kelor (<i>Moringa oleifera</i> Lamk).....	33
2.5.1	Nama.....	33
2.5.2	Klasifikasi	33
2.5.3	Deskripsi Umum	33
2.5.4	Morfologi Tanaman Kelor	33
2.5.5	Kandungan Polifenol dalam Kelor sebagai Antioksidan	34
2.5.6	Mekanisme Kerja Polifenol dalam Daun Kelor sebagai Antioksidan.....	35
2.5.7	Penelitian Efek Kelor sebagai Zat Antioksidan.....	36
2.6	<i>Rattus norvegicus</i>	37
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		40
3.1	Kerangka Teori.....	40
3.2	Kerangka Konsep	43
3.3	Hipotesis Penelitian	45
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		46
4.1	Desain Penelitian.....	46
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	47
4.2.1	Tempat Penelitian.....	47
4.2.2	Waktu Penelitian.....	47
4.3	Populasi dan Sampel Penelitian	47
4.3.1	Kriteria Pengambilan Sampel	47
4.3.2	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	48
4.3.3	Besar Sampel.....	48
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	48
4.4.1	Variabel Penelitian.....	48
4.4.2	Definisi Operasional	49
4.5	Aklimatisasi dan Pemeliharaan Tikus	50
4.6	Prosedur Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor ...	50
4.6.1	Ekstraksi.....	50
4.6.2	Bahan.....	50
4.6.3	Alat.....	50
4.6.4	Prosedur Ekstraksi Air Daun Kelor.....	50
4.6.5	Pembuatan Sediaan Ekstrak Air Daun Kelor	51
4.7	Injeksi DMPA.....	51
4.8	Prosedur Terminasi	52

4.9	Pengambilan Organ Uterus	52
4.9.1	Bahan dan Alat.....	52
4.9.2	Prosedur Pengambilan Organ Uterus	52
4.10	Prosedur SOD	53
4.10.1	Persiapan Bahan dan Alat.....	53
4.10.2	Menghomogenkan jaringan	53
4.10.3	Reagen Preparation	54
4.10.4	SOD Assay.....	54
4.11	Prosedur Pengerjaan Preparat.....	55
4.12	Pemeriksaan Indeks Apoptosis.....	56
4.12.1	Kit dan Bahan.....	56
4.12.2	Prosedur Pemeriksaan Indeks Apoptosis	56
4.13	Analisis Data	57
4.13.1	Uji Prasyarat Parametrik.....	57
4.13.2	Uji Anova One Way	57
4.13.3	Uji Pearson Product Moment.....	58
4.14	Bagan Alur Penelitian	59
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA		60
5.1	Hasil Penelitian.....	60
5.1.1	Pembuatan Ekstrak Air Daun Kelor	60
5.1.2	Analisis Fitokimia secara Kualitatif dan Kuantitatif	60
5.2	Hasil Pengukuran Kadar SOD dan Indeks Apoptosis.....	61
5.2.1	Kadar SOD	61
5.2.2	Indeks Apoptosis	64
5.2.3	Korelasi Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis.....	67
BAB 6 PEMBAHASAN.....		69
6.1	Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Kelor Terhadap Kadar SOD Uterus Tikus Wistar	69
6.2	Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Kelor Terhadap Indeks Apoptosis Endometrium Tikus Wistar.....	75
6.3	Korelasi Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis.....	80
BAB 7 KESIMPULAN.....		84
7.1	Kesimpulan.....	84
7.2	Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA.....		86
LAMPIRAN		95
RIWAYAT HIDUP.....		129

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Penelitian tentang Kelor sebagai Zat Antioksidan.....	36
Tabel 4.1 Definisi Operasional	49
Tabel 5.1 Kadar SOD dan Indeks Apoptosis.....	61
Tabel 5.2 Kadar SOD pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor	62
Tabel 5.3 Indeks Apoptosis pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor.....	64
Tabel 5.4 Indeks Apoptosis pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor.....	67
Tabel 5.5 Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis.....	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Turunan 17- β -hidroksiprogesteron Asetat (17-Asetoksiprogesteron)	12
Gambar 2.2	Mekanisme Kerja Estradiol sebagai Antioksidan	17
Gambar 2.3	Endometrium pada Awal dan Akhir Fase Proliferasi	19
Gambar 2.4	Endometrium pada Awal dan Akhir Fase Sekretorik.....	20
Gambar 2.5	Histologi Endometrium pada Fase Sekretorik Normal sebelum Menggunakan Kontrasepsi	23
Gambar 2.6	Histologi Endometrium setelah Dipapar DMPA	23
Gambar 2.7	Cara kerja antioksidan	26
Gambar 2.8	Mekanisme secara Umum Penangkapan O_2^- oleh SOD	27
Gambar 2.9	Aktivitas Enzim Antioksidan.....	28
Gambar 2.10	Jalur apoptosis	31
Gambar 2.11	Daun dan Pohon kelor.....	34
Gambar 2.12	Rattus norvegicus wistar	38
Gambar 2.13	Organ Reproduksi Tikus Betina.....	39
Gambar 3.1	Kerangka Teori Penelitian	40
Gambar 3.2	Kerangka Konsep Penelitian	43
Gambar 4.1	Skema Desain Penelitian	46
Gambar 4.2	Bagan Alur Penelitian.....	59
Gambar 5.1	Histogram Rata-Rata Kadar SOD pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor	62
Gambar 5.2	Gambaran Immunohistokimia Sel yang Apoptosis pada Endometrium.....	64
Gambar 5.3	Histogram Rata-Rata Indeks Apoptosis.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Determinasi Tanaman Kelor.....	95
Lampiran 2	Peminjaman Fasilitas dan Laboratorium Farmasi	96
Lampiran 3	Surat Keterangan Uji Kualitatif Fitokimia	97
Lampiran 4	Laporan Hasil Analisa Total Fenol Ekstrak Air Daun Kelor	98
Lampiran 5	Perhitungan Total Flavonoid (Quercetin Equivalent).....	99
Lampiran 6	Surat Keterangan Pelaksanaan Freeze Drying.....	101
Lampiran 7	Surat Keterangan Kesehatan Hewan	102
Lampiran 8	Keterangan Kelaikan Etik.....	103
Lampiran 9	Keterangan Penggunaan Laboratorium Parasitologi	104
Lampiran 10	Surat Keterangan Bebas Plagiarisme dengan Perangkat Lunak Turnitin	105
Lampiran 11	Hasil Pengukuran Kadar SOD dan Indeks Apoptosis	106
Lampiran 12	Dokumentasi Penelitian.....	107
Lampiran 13	Uji Asumsi Normalitas Data.....	120
Lampiran 14	Uji Asumsi Homogenitas Ragam.....	121
Lampiran 15	Uji Beda antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Kadar SOD.....	122
Lampiran 16	Uji Beda antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks Apoptosis.....	124
Lampiran 17	Uji Korelasi antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks Apoptosis.....	126
Lampiran 17	Uji Korelasi antara Kadar SOD dan Indeks Apoptosis	127
Lampiran 18	Bukti publikasi jurnal.....	128

DAFTAR SINGKATAN DAN SIMBOL

μl	:	Mikroliter
A*	:	Radikal antioksidan
AH	:	Antioksidan
ALL	:	Acute lymphoblastic leukemia
AML	:	Acute myeloid leukemia
Apaf-1	:	Apoptotic activating factor-1
BHA	:	Butil hidroksi anisol
BHT	:	Butil hidroksi toluen
BMI	:	Body mass index
Buffer HEPES	:	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
CARD	:	Caspase Recruitment Domain
CAT	:	Catalase
CCL ₄	:	Parafin Cair
cm	:	Centimeter
Cu	:	Tembaga
DISC	:	Death Inducing Signaling Complex
DMPA	:	Depo medroxyprogesterone asetat
DNA	:	Deoxyribo Nucleic Acid
DPPH	:	2,2-diphenylpicrylhydrazyl
E2	:	Estradiol
ER	:	Reseptor estrogen
FADD	:	Fas Associated Death Domain
Fe ²⁺	:	Kation Ferro
FDA	:	Food Drug Administration

FSH	: Follicle stimulating hormone
GnRH	: Gonadotropin-releasing hormone
GPx	: Glutathione peroksida
GSSH	: Glutathion disulfida
H ⁺	: Hidrogen Positif
H ₂ O	: Hidrogen Monoksida (Air)
H ₂ O ₂	: Hidrogen peroksida
HCl	: Asam Hidroklorida
HDL	: Hight-density lipoprotein
IM	: Intramuscular
IMS	: Inter membran spase
IUD	: Intra Uterine Device
IUFD	: Intra Uterine Fetal Death
KB	: Keluarga Berencana
kg	: Kilogram
LDL	: Low-density lipoprotein
LH	: Luteinizing hormone
LPO	: Peroksida Lipid
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
mg	: Miligram
ml	: Mililiter
Mn	: Mangan
MnSOD	: Manganese-superoxide dismutase
MOCE	: Moringa Oleifera Crude Extract
MOCF	: Moringa Oleifera chloroform/ non-phenolic fraction
MODF	: Moringa Oleifera diethyl ether fraction

MOEF	: Moringa Oleifera ethyl acetate/ polyphenolic fraction
MOR	: Moringa Aqueous/ residue fraction
MPA	: Medroxyprogesterone asetat
NACl	: Natrium Chlorida
NADPH	: Nikotinamida adenin dinukleotida fosfat
NFκ	: Nuclear Factor Kappa Beta
O ₂	: Oksigen
O ₂ ⁻	: Superoksida radikal
OD	: Optical Density
PAK	: p21-activated kinase
PBS	: Phosphate buffered saline
PID	: Pelvik inflammatory disease
POK	: Pil oral kombinasi
PUS	: Pasangan Usia Subur
R ⁻ , R [*] , ROO [*]	: Radikal Lipid
ROO ⁻	: Radikal Lipid Peroksil
ROS	: Reactive Oxygen Species
SC	: Subcutan
Se	: Selenium
SHBG	: Sex hormonbinding globulin
SOD	: Superokdisa dismutase
TBHQ	: Tert-butil, hidroksi quinon
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL	: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligan
WHO	: World Health Organization
WUS	: Wanita Usia Subur

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keluarga berencana (KB) adalah cara untuk mencapai keluarga yang berkualitas dengan meningkatkan kesehatan keluarga, ibu, perempuan dan anak melalui pelayanan, informasi, pendidikan dalam merencanakan kehamilan, kelahiran dan hal – hal yang berhubungan dengan hak reproduksi. Kelompok wanita usia subur usia 15-49 tahun merupakan sasaran utama pada pelayanan KB. Para peserta KB aktif banyak menggunakan kontrasepsi suntik sebanyak 47,54% selanjutnya pil sebanyak 23,58% (Kementerian Kesehatan RI, 2015).

Depo medroxyprogesterone acetate/ DMPA adalah kontrasepsi suntik yang sering digunakan. Dosis DMPA adalah 150 mg/mL yang diberikan 3 bulan sekali. Mekanisme kerja DMPA adalah menghambat pelepasan GnRH sehingga pelepasan Follicel Stimulating Hormone/ FSH dan Luteinizing Hormone/ LH dari hipofisis anterior menurun. DMPA dalam sirkulasi akan menghambat lonjakan LH pada pertengahan siklus (Hartanto, 2003; Prawirohardjo, 2003; Varney et al., 2006; Mishell, 2006).

DMPA merupakan turunan progesteron (medroksiprogesteron) (Hartanto, 2003). Penggunaan kontrasepsi progestin juga dapat menghambat hormon estrogen dan kemampuan 17 β -estradiol (E2) yang merupakan salah satu golongan estrogen yang dapat meningkatkan mekanisme perlindungan antioksidan, perokidasi lipid dan menginduksi proliferasi uterus, disamping itu penggunaan kontrasepsi progestin juga dapat merugikan pertahanan antioksidan yaitu dengan menurunkan aktivitas/ekspresi manganese-superoxide dismutase (MnSOD) (Lizarelli et al., 2009; Irwin, et al., 2011). Antioksidan superoksida dismutase (SOD) adalah enzim antioksidan yang penting dalam mengeliminasi superoksida radikal (O_2^-) dan dapat menghambat terjadinya apoptosis dan merubah O_2^- menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) (Hu, et al., 2005; Silva

et al., 2010). Penurunan tingkat SOD dan akumulasi radikal superoksida akan menyebabkan kematian sel apoptosis (Hu, et al., 2005; Silva et al., 2010).

Penggunaan kontrasepsi progestin jangka panjang dapat menimbulkan radikal bebas meningkat sehingga terjadi stress oksidatif (Krikun et al., 2002). Pada sel yang normal terdapat keseimbangan pada pro-oksidan/oksidan. Pergeseran keseimbangan pada pro-oksidan akan menyebabkan stres oksidatif yang ditunjukkan dengan peningkatan radikal bebas yang mengakibatkan terjadinya kerusakan sel (Cheeseman dan Slater, 1993). Radikal bebas adalah molekul yang dapat menyebabkan stress oksidatif akibat ketidakseimbangan pertahanan sistem antioksidan dengan radikal bebas. ROS (Reactive Oxygen Species) yang berlebihan akan merangsang kerusakan oksidatif pada biomolekul yang penting seperti protein, DNA, lipoprotein dan lipid sehingga menyebabkan apoptosis sel (Yazdanparast dan Ardestani, 2007).

DMPA juga dapat menginduksi apoptosis pada sel endometrium. Setelah suntikan pertama dan kedua, akseptor yang menggunakan DMPA mempunyai histologi endometrium yang atrofi, penurunan kepadatan microvaskuler, penipisan epitel endometrium, penipisan dan fragilitas kelenjar dan dinding pembuluh darah sehingga menimbulkan gangguan perdarahan, gangguan perdarahan yang abnormal inilah yang menyebabkan banyak akseptor KB menghentikan pemakaian kontrasepsi progestin jangka panjang (Krikun et al., 2002; Simbar, 2007; Choksuchat et al., 2009; Lizarelli et al., 2009)

Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) adalah salah satu tanaman yang sangat terkenal dari famili *moringace* yang meningkatkan sistem kekebalan tubuh dibanyak negara berkembang dan memiliki kandungan zat antioksidan (Krisnadi, 2015). Banyak masyarakat yang mengkonsumsi kelor karena kandungan nutrisi, mineral, vitamin dan asam amino esensial lengkap, antioksidan kuat tertinggi serta harganya yang murah dan mudah didapat. Salah satu bagian tanaman yang sering dikonsumsi masyarakat adalah bagian daun (Ghasi et al., 2000; Liu et al., 2007; Krisnadi, 2015). Daun kelor

dibuat sayur seperti halnya bayam atau kangkung, daun kelor tua biasanya dibuat serbuk daun kering dengan proses pengilingan (Ghasi et al., 2000; Krisnadi, 2015). Disamping itu daun kelor juga sudah banyak disajikan dan diminum sebagaimana teh seduh (Kelorina, 2016; Ismiyanto, 2016).

Menurut hasil beberapa penelitian diketahui bahwa ekstrak air daun kelor mempunyai sifat antioksidan dengan meningkatkan aktivitas enzim SOD dan memiliki kandungan antioksidan (Lamau et al., 2016; Verma et al., 2009; Khalafalla et al., 2010). Kandungan antioksidan dari daun kelor yang potensial adalah polifenol misalnya fenol dan flavonoid yang dapat menangkap radikal bebas (Moyo et al., 2012; Krisnadi, 2015; Khalafalla et al., 2010). Polifenol pada daun kelor ini menunjukkan kapasitas antioksidan yang tinggi dan merupakan kelas utama antioksidan alami dan diyakini bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan pada tanaman (Lako et al., 2007; Kanatt, 2007). Polifenol potensial melindungi agen terhadap efek mematikan dari stres oksidatif, melindungi DNA dari kerusakan oksidatif, menangkalkan radikal bebas dan menghambat peroksida lipid / kerusakan lemak yang dapat menyebabkan apoptosis (Sestili et al., 1998; Moyo et al., 2012). Selanjutnya kandungan fenol pada ekstrak air daun kelor menunjukkan aktivitas antioksidan dengan memberikan elektron yang baik dan mengakhiri reaksi berantai radikal dengan mengkonversi radikal bebas menjadi produk yang stabil (Siddhuraju dan Becker, 2003). Fenol juga mungkin berkontribusi dari kemampuan ekstrak untuk menyerap serta menetralkan radikal bebas atau mengurai peroksida (Adedapo et al., 2008). Kemampuan fenol dalam menetralkan radikal bebas karena fenol memiliki sifat reduksi dan konjugasi struktur ring dan karboksil yang dapat menghambat peroksida lipid (Oyedemi, Bradley dan Afolayan, 2010).

Pada hasil studi pendahuluan diketahui bahwa ekstrak air daun kelor memiliki kandungan polifenol. Selanjutnya hasil uji total fenol dan total flavonoid (quercetin equivalent) yang dianalisis dengan metode spektrofotometri dari 50 gram simplisia daun kelor yang direndam pada 0,5 liter air 40°C (Handa, 2008), 50 gram simplisia

daun kelor yang direndam pada 0,5 liter air 70⁰C (Siregar dkk., 2015), 50 gram simplisia daun kelor yang direndam pada 0,5 liter air 100⁰C (Lamau et al., 2016) menunjukkan simplisia daun kelor yang direndam dengan air 70⁰C memiliki kadar total fenol rata-rata yang tertinggi yaitu 1,38 ± 0,00 % dan kadar total flavonoid (quercetin equivalent) yang tertinggi yaitu 0,063 %.

Berdasarkan latar belakang dan studi pendahuluan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada pengaruh ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA?

Sub masalah :

- 1) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA?
- 2) Apakah ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA?
- 3) Apakah ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA?
- 4) Apakah ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA?
- 5) Apakah ada hubungan antara Kadar SOD pada uterus dengan indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Menganalisis perbedaan pengaruh berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 2) Menganalisis hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 3) Menganalisis perbedaan pengaruh berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 4) Menganalisis hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 5) Menganalisis hubungan antara kadar SOD pada uterus dan indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu tentang pengaruh ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

1.4.2 Manfaat Praktis

Ekstrak air daun kelor dapat digunakan untuk mengatasi berbagai keluhan dan efek samping yang terjadi khususnya gangguan menstruasi pada akseptor KB DMPA dan memberdayakan herbal di Indonesia

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. DMPA

2.1.1 Pengertian dan Klasifikasi

DMPA (Depo medroxyprogesterone acetate) merupakan kontrasepsi suntikan progestin yang mengandung 150 mg DMPA yang diberikan secara intramuscular. Suntikan ini diberikan setiap 3 bulan (Prawirohardjo, 2003; Brahm, 2007). DMPA adalah kontrasepsi yang berbentuk cair memiliki kandungan kristal-kristal kecil depot medroksiprogesteron acetate (turunan progesteron). Pada pemberian DMPA dosis tidak perlu disesuaikan dengan berat badan klien (Varney, 2006).

Di USA terdapat 2 macam DMPA yaitu DMPA yang diberikan secara IM (150 mg/ml) dan DMPA yang diberikan secara SC (104 mg/0,65 ml). DMPA adalah analog sintetik dari 17 -hidroksiprogesteron (Nelson, 2010). Dosis total yang diberikan secara SC adalah 30% lebih rendah dibandingkan dengan DMPA yang diberikan secara IM (Cameron, 2013)

2.1.2 Mekanisme Kerja

2.1.2.1. Primer : mencegah ovulasi

Mekanisme kerja dari DMPA adalah menghambat pulsasi dan pelepasan gonadotropin-releasing hormone (GnRH); dan menekan Luteinizing hormone (LH) pada masa preovulatorik. DMPA memblokir LH surge, yang mencegah terjadinya ovulasi. Apabila Injeksi DMPA diberikan pada 7 hari pertama menstruasi maka akan menekan ovulasi. Namun, apabila injeksi DMPA antara hari ke-10 dan hari ke- 13 menstruasi maka tidak menghambat ovulasi pada 30% pasien (Fritz dan Speroff, 2005; Jurow dan Shoupe, 2006; Nelson, 2010).

DMPA merupakan kontrasepsi progestin dengan mekanisme kerja menghambat sekresi hormon pemicu folikel (FSH) dan LH serta lonjakan LH. Pemberian DMPA pada lima hari sejak awal menstruasi dapat mencegah ovulasi pada bulan pertama sehingga efek kontrasepsi dapat cepat. Namun klien perlu menggunakan kontrasepsi penunjang apabila DMPA diberikan lebih dari lima hari setelah menstruasi, karena kemungkinan bisa terjadi ovulasi pada bulan tersebut (Hartanto, 2003; Varney, 2006; Brahm, 2007)

DMPA SC dapat menekan konsentrasi estradiol dan kemampuan secara langsung menyebabkan penipisan dan atropi pada lesi endometriosis sehingga kontrasepsi ini digunakan untuk terapi pada nyeri endometrium (Jurow dan Shoupe, 2006)

2.1.2.2. Sekunder

Mekanisme kerja sekunder DMPA adalah lendir servik kental dan sedikit, selanjutnya endometrium akan tidak bagus untuk penempelan dari sel telur yang telah fertilisasi dan transport ovum didalam tuba fallopi akan terganggu (Hartanto, 2003; Jurow dan Shoupe, 2006; Varney, 2006; Nelson, 2010). Endometrium tampak dangkal dan atrofis, kelenjar-kelenjar tidak aktif dan odem pada stroma. Pada hasil biopsi klien akseptor lama DMPA endometrium sedikit didapatkan. Tetapi, setelah 90 hari pemberian DMPA perubahan tersebut kembali normal dan perubahan endometrium ini berdampak pada perdarahan (Hartanto, 2003; Nelson, 2010).

Menurut Brahm (2007) bahwa mekanisme kerja obat ini tampaknya multiple, peningkatan kekentalan mucus, menambah viskositas lendir serviks sehingga masuknya spermatozoa mengalami hambatan ke dalam rahim. adanya perubahan pada suasana endometrium menyebabkan sulit untuk terjadi nidasi. Selain itu kontrasepsi ini juga menipiskan endometrium sehingga tidak siap untuk hamil lagi.

2.1.3 Farmakokinetik

2.1.3.1. Absorpsi

MPA (medroxyprogesterone acetate) secara esensial memiliki bioavailabilitas 100% dan merupakan bentuk yang sudah aktif. MPA mempunyai afinitas yang kuat dengan sex hormone binding globulin (SHBG), reseptor progesteron uterus, albumin dan alfa₂ globulin. Progesteron secara cepat diabsorpsi setelah masuk ke dalam tubuh baik secara oral maupun parenteral. Sebagian progesteron disimpan sementara dalam lemak tubuh sehingga bila diberikan dalam dosis tinggi akan berupa depot (Nelson, 2010).

Setelah satu suntikan dengan dosis 150 mg i.m. DMPA, 17 acetoxyl -6 methyl progestin dapat terdeteksi di serum dalam 30 menit. DMPA di sirkulasi akan menghambat lonjakan LH pada pertengahan siklus, namun LH dan FSH tetap dalam kadar yang sama dengan pretreatment control cycle (Fase Luteal) (Nelson, 2010).

DMPA menghambat ovulasi dengan menekan keluarnya luteinizing hormone sehingga kadar progesteron dalam serum tetap rendah (<0,4 ng/ml) selama beberapa bulan setelah penyuntikan. Bila kadarnya turun < 0,1 ng/ml, maka ovulasi dapat terjadi. Waktu paruh DMPA setelah disuntikan i.m adalah 50 hari. Kadar serum MPA tidak begitu berfluktuasi karena memiliki sifat lipofilik yang rendah dan pada penyuntikan tidak terbentuk depo-sekunder. Estradiol rata-rata 50 pg/nL pada fase mid folikuler dini setelah penyuntikan DMPA, kadar estradiol serum mulai meningkat 4 bulan setelah 1 kali suntikan DMPA, ketika kadar DMPA turun < 0,5 ng/ml. Namun pada wanita yang telah menggunakan DMPA selama beberapa tahun, kadar serum estradiol bisa mencapai level terendah hingga 10 pg/ml (Cunningham et al., 2005).

Pada pemberian DMPA secara intramuscular (IM) kadar MPA (medroksiprogesteron acetate) akan meningkat terus ± 3 minggu dan mencapai

puncak plasma dengan konsentrasi 1-7 ng/ml. Kadar MPA secara bertahap menurun sampai kadar MPA tidak terdeteksi (<100 pg/ml) pada 120-200 hari setelah dilakukan injeksi. Waktu paruh adalah sekitar 50 hari (Nelson, 2010). Bagi wanita yang telah menggunakan DMPA selama beberapa tahun, kadar estradiol serum berkisar antara 10 dan 92 pg / mL, dengan tingkat rata-rata sekitar 40 pg / mL. Meskipun tingkat estradiol rendah, sangat jarang ditemukan hot flushes. Wanita yang menggunakan DMPA selama beberapa tahun tidak ditemukan perubahan dalam ukuran payudara. DMPA menyebabkan endometrium menjadi atrofi, dengan kelenjar endometrium dan stroma desidialis yang kecil dan lurus. Lendir serviks tetap tebal dan kental. DMPA adalah bentuk yang sangat efektif kontrasepsi karena beberapa mekanisme kerjanya dan lambat dilepaskan ke dalam sirkulasi (Mishell, 1996).

Pada DMPA yang diberikan secara SC, nilai rata-rata serum AUC₀ pada 92.84 ng/hari/ml dibandingkan dengan 134 ng/hari/ml pada DMPA yang diberikan secara IM. Rata-rata absorpsi adalah lebih lambat dibanding dengan DMPA yang diberikan secara IM. DMPA yang diberikan secara SC menekan ovulasi lebih dari 13 minggu pada semua subyek dan tidak terpengaruh oleh body mass index (BMI) atau ras. Berarti jumlah hari untuk kembali ovulasi dengan DMPA yang diberikan secara SC adalah lebih pendek daripada DMPA yang diberikan secara IM (180,2 hari), dengan range 70-315 hari (Nelson, 2010). Tingkat penyerapan lebih lambat dan Tingkat MPA puncak lebih rendah pada pemberian secara SC daripada pemberian secara IM. Tingkat MPA serum ditemukan lebih tinggi pada akhir interval pemberian secara SC, namun DMPA yang diberikan secara SC mempunyai keunggulan, efektifitas dan keamanan yang sama dengan DMPA yang diberikan secara IM (Sierra-Ramírez, et al., 2011).

Interval injeksi yang direkomendasikan adalah untuk DMPA yang diberikan secara SC adalah 13 ± 1 minggu, Median waktu untuk kembali ovulasi setelah pemberian DMPA secara SC itu sesuai dengan DMPA-IM; dan pada 12 bulan pasca injeksi, studi menunjukkan bahwa ovulasi akan kembali normal pada 97% dari subyek, Konsentrasi DMPA yang diberikan secara SC tidak berbeda secara signifikan antara injeksi yang diberikan pada dinding perut depan atau paha anterior, hal ini menunjukkan bahwa tempat suntikan tidak mempengaruhi efek kontrasepsi (Cameron, 2013).

2.1.3.2. Distribusi

Medroxyprogesterone kira-kira 90 - 95% terikat protein, melewati sawar darah dan otak, dan disekresi melalui air susu. Dalam darah gestagen turunan progesteron diikat oleh albumin (Nelson, 2010).

2.1.3.3. Metabolisme

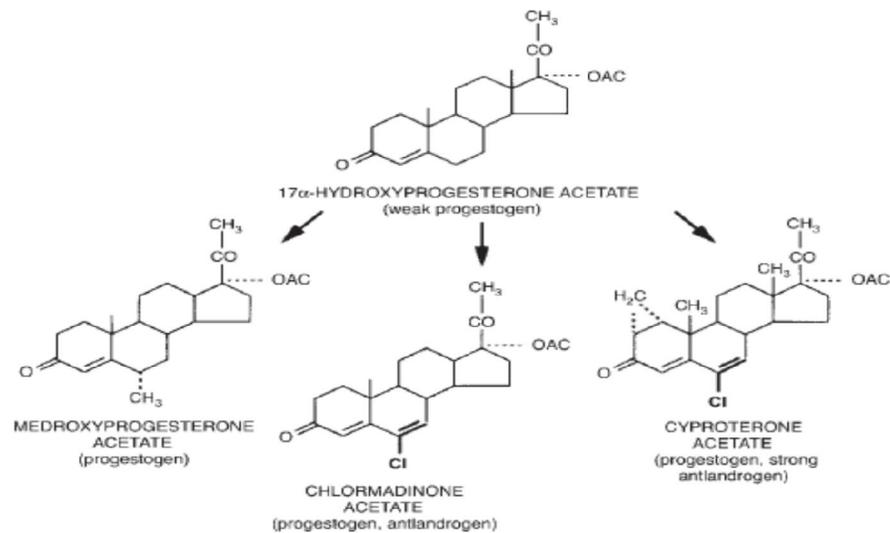
MPA dimetabolisme dalam tubuh hampir lengkap dalam satu jalur ke hepar oleh CYP3A4 . Progesteron di hepar akan mengalami metabolisme menjadi pregnandiol dan mengalami konjugasi dengan asam glukoronat dan sulfat yang nantinya akan disekresi melalui urin (Nelson, 2010).

2.1.3.4. Ekskresi

Zat metabolit utama DMPA yaitu 6 α -methyl-6 β , 17 β , 21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione-17-acetate diekskresi melalui urine (Nelson, 2010).

2.1.4 Farmakodinamik

Medroksiprogesteron asetat (MPA) merupakan turunan dari progesteron. MPA adalah senyawa 17-asetoksiprogesteron dan merupakan satu-satunya progestin jenis ini (turunan progesteron) yang digunakan untuk kontrasepsi (Jurow dan Shoupe, 2006)



Gambar 2.1 Turunan 17 -hidroksiprogesteron Asetat (17-Asetoksiprogesteron)

Turunan 17-hidroksiprogesteron asetat (17-asetoksiprogesteron) termasuk medroksiprogesteron asetat, chlormadinon asetat dan ciproteron asetat. Manipulasi struktur steroid secara signifikan menghasilkan perubahan dalam progestational dan aktivitas anti androgen.

MPA dapat dideteksi dalam sirkulasi sistemik dalam waktu 30 menit setelah injeksi intramuskular. Tingkat MPA terus naik dan mencapai tingkat efektif dalam darah (<0,5 ng/ mL) dalam waktu 24 jam setelah injeksi. Tingkat MPA tetap pada tingkat yang efektif untuk setidaknya 3 bulan dan terdeteksi dalam sirkulasi (<0,2 ng/ mL) pada beberapa akseptor DMPA hingga akhir 7-9 bulan. Tingkat MPA serum pada banyak akseptor DMPA tetap pada tingkat yang efektif selama 4-6 bulan. Panjangnya durasi tersebut sebenarnya karena lambatnya absorpsi dari tempat injeksi. Kadar estradiol bervariasi, namun tetap dibawah 100 pg/ mL selama 4 bulan pertama setelah injeksi. Kadar estradiol pada hari injeksi ulangan DMPA bervariasi antara 15-100 pg/ mL (mean : 42 pg/ mL) (Jurow dan Shoupe, 2006).

2.1.5 Efektifitas

DMPA sangat efektif dengan tingkat kegagalan yang sangat rendah dibandingkan dengan IUD dan metode kontrasepsi yang lain. DMPA harus tersedia sebagai metode garis pertama untuk semua wanita yang ingin membuat suatu pilihan tentang metode kontrasepsi yang reversibel. Sebelum penggunaan kontrasepsi DMPA sangat penting untuk melakukan konseling dan meminimalkan efek dari perubahan menstruasi yang terjadi pada kebanyakan pasien. Penggunaan DMPA tidak berpengaruh terhadap hubungan seksual (Bigrigg et al., 1999).

DMPA kontrasepsi hormonal yang sangat populer dan sangat efektif. DMPA saat ini digunakan oleh 13×10^6 perempuan. Tingkat kegagalan adalah 0-0.7 per 100 Wanita/ tahun, yang sebanding dengan kontrasepsi steril (Sereepapong et al., 2004). DMPA sangat efektif apabila wanita rutin untuk mendapat suntikan. Angka kegagalan adalah 3 kehamilan per 100 wanita setelah 1 tahun lebih penggunaan kontrasepsi DMPA. Berarti ada 97 dari setiap 100 wanita yang menggunakan kontrasepsi DMPA yang tidak hamil (WHO, 2011).

Pada kontrasepsi DMPA SC (Depo-sub Q) tidak ada kehamilan yang terdeteksi pada 2042 wanita yang menggunakan DMPA SC selama 1 tahun. Pada penggunaan secara teratur, tingkat kehamilan adalah 0,3%, dengan tingkat kegagalan 3% (Jurow dan Shoupe, 2006).

2.1.6 Keuntungan dan Keterbatasan

DMPA IM diberikan setiap 3 bulan, DMPA merupakan metode yang sangat efektif, bisa digunakan untuk wanita menyusui (Jurow dan Shoupe, 2006; WHO, 2011). DMPA menurunkan resiko kehilangan darah yaitu menurunkan resiko anemia dan amenore yang merupakan keuntungan bagi beberapa akseptor KB DMPA. Mengurangi dismenore, menurunkan resiko kanker

endometrium dan kanker ovarium. Menurunkan resiko pelvik inflammatory disease (PID) dan kehamilan ektopik (Jurow dan Shoupe, 2006).

DMPA yang diberikan secara SC mempunyai berbagai keuntungan dan keamanan apabila dibandingkan dengan DMPA yang diberikan secara IM yaitu peningkatan kenyamanan dan pemberian. DMPA SC lebih efisien, aman dan mempunyai tingkat absorpsi yang rendah sehingga konsentrasi puncak serum MPA lebih rendah dan durasi efeknya bertahan lama, tingkat MPA dipertahankan di atas konsentrasi minimum yang diperlukan untuk penekanan ovulasi lebih dari satu period 3 bulan dengan dosis SC 30% lebih rendah dibandingkan dengan DMPA IM (Jain et al., 2004; Sierra-Ramirez et al., 2011)

Keterbatasan pada pemakaian DMPA adalah gangguan menstruasi, tergantung pada tempat pelayanan kesehatan untuk dapat injeksi DMPA, tidak memberi perlindungan dari penyakit menular seksual, HIV, dan hepatitis B, terlambat kembali kesuburan karena DMPA masih belum habis terlepas dalam tubuh (Prawirohardjo, 2003)

2.1.7 Efeksamping

2.1.7.1 Efeksamping jangka pendek

1) Menurunkan kadar SOD dan meningkatkan indeks apoptosis

Penggunaan DMPA dapat menurunkan kadar SOD pada ovarium dan menginduksi apoptosis pada endometrium tikus, ovarium tikus dan human endometrial endothelial cells (HEECs) (Choksuchat et al., 2009; Veri et al., 2015).

2) Berat badan bertambah

Menurut Firtz dan Speroff (2005) bahwa penggunaan DMPA selama 2 tahun dapat mengakibatkan peningkatan berat badan (2,1%).

- 3) Sakit kepala, nyeri payudara, nyeri abdomen, gelisah dan depresi.

Sakit kepala dan nyeri payudara pernah dilaporkan terjadi pada pemakaian kontrasepsi injeksi progestin (Cunningham et al., 2005). Sakit kepala (2,3%), pusing (1,2%), nyeri abdomen (1,1%) dan gelisah (0,7%) dapat terjadi pada penggunaan DMPA selama 2 tahun (Firtz dan Speroff, 2005)

- 4) Gangguan haid

Penggunaan DMPA selama 2 tahun masalah utama yang sering terjadi adalah gangguan menstruasi (Firtz dan Speroff, 2005). Pada 3 bulan pertama pemakaian DMPA akan terjadi perubahan pada pola haid yaitu perdarahan ireguler dan perdarahan yang lama. Pada satu tahun pemakaian DMPA, perdarahan tidak terjadi setiap bulan, frekuensi perdarahan tidak teratur dan perdarahan ireguler. (WHO, 2011).

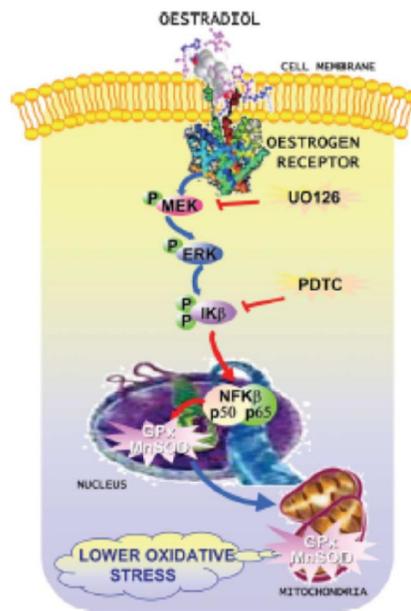
2.1.7.2 Efeksamping jangka panjang

- 1) Insiden anemia defisiensi besi menurun pada para pemakai jangka panjang, mungkin karena amenorea yang berkepanjangan (Cunningham et al., 2005; Jurow dan Shoupe, 2006).
- 2) Risiko kanker payudara saling bertentangan. Dari hasil berbagai studi kasus kontrol di Selandia Baru dan World Health Organization, yang mencakup hampir 1800 wanita dengan kanker payudara dan 14000 kontrol. Dalam 5 tahun pertama pemakaian, kontrasepsi dilaporkan berkaitan dengan peningkatan risiko kanker dua kali lipat, tetapi risiko keseluruhan tidak meningkat (Cunningham et al., 2005).
- 3) Risiko keganasan serviks dan hati tidak meningkat dan resiko kanker ovarium dan endometrium menurun pada wanita yang menggunakan kontrasepsi progestin suntik. Namun risiko karsinoma in situ serviks mungkin meningkat (Cunningham et al., 2005).

2.1.8 Hubungan DMPA dengan Estrogen dan Reseptor Estrogen

Penggunaan kontrasepsi progestin dapat menghambat kemampuan 17 β -estradiol (E2) dan penurunan jumlah reseptor estrogen (Irwin et al., 2011; Jain et al., 2005). Pengaruh hormon estrogen dimediasi melalui reseptor estrogen intraseluler yang berhubungan yang bervariasi dalam konsentrasi menurut siklus menstruasi dan mewujudkan efek struktural dan fungsional dalam saluran telur, rahim dan organ sasaran lainnya. Pada fase folikular menuju fase ovulasi reseptor estrogen mengalami kenaikan dan menurun pada fase luteal. Intensitas dari reseptor estrogen lebih banyak pada glandula epitel endometrium daripada tuba falopi (Amso, 1994; Hegazy, 2015). Hasil imunositokimia dan in situ hybridization dari organ reproduksi tikus bahwa dikelenjar hipofisis ER ditemukan disebagian besar inti sekretori sel dihipofisis anterior dan tidak ditemukan di lobus intermediat dan posterior. ER tidak terdeteksi pada lobus hipofisis. Di tuba falopi dan uterus, ER ditemukan dalam inti sel epitel serta dari stroma dan sel otot. ER mRNA ditemukan dalam sel-sel granulosa dari folikel yang tumbuh, sementara ER terdapat dalam sel teka, sel-sel kelenjar interstitial dan epitel germinal. ER dan ER terdeteksi di dalam ovarium. ER tidak terdeteksi di tuba falopi dan uterus (Pelletier, 2000).

Estrogen memiliki sifat antioksidan dan bertanggung jawab pada tingkat produksi radikal bebas karena kemampuan untuk mengikat reseptor estrogen dan meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti Glutathione Peroxidase (GPx) dan Superoxide Dismutase (SOD) melalui jalur sinyal intraselular serta mencegah dari stress oksidatif dan apoptosis sel (Vina, 2005; Borrás et al., 2010).



Gambar 2.2 Mekanisme Kerja Estradiol sebagai Antioksidan. Berdasarkan penelitian secara in vitro dengan menggunakan jaringan kelenjar payudara manusia menunjukkan bahwa estradiol bekerja dengan berikatan dengan reseptor estrogen di membran sel. Kemudian mengaktifkan MAP kinase, selanjutnya aktivasi NFκ, dan terjadi upregulasi gen antioksidan seperti MnSOD dan GPx (Vina et al., 2005).

2.1.9 Fisiologi dan Pengaruh DMPA pada Endometrium

2.1.9.1 Perubahan anatomi, fungsi endometrium dan hormonal pada siklus menstruasi.

Perubahan – perubahan endometrium pada siklus menstruasi adalah endometrium menstruasi, fase proliferasi, fase sekretorik, persiapan implantasi, dan akhirnya fase peluruhan endometrium.

1) Endometrium menstruasi.

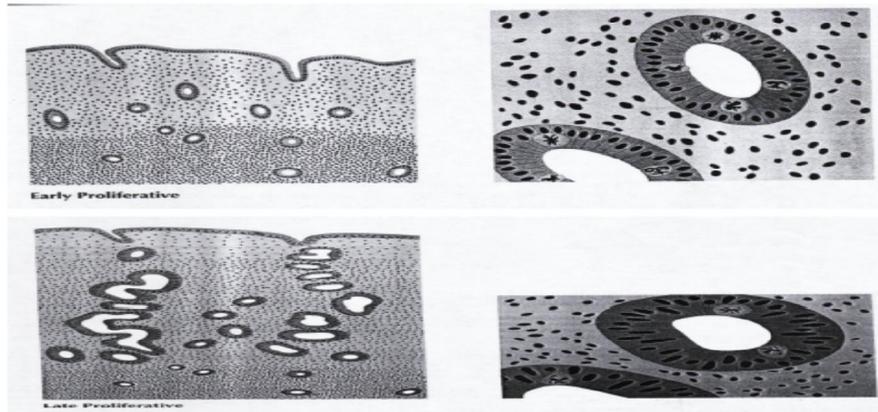
Jaringan padat namun tipis dan siklus antara fase proliferasi dan eksplorasi, pada saat menstruasi dua pertiga endometrium yang fungsional luruh. Semakin cepat kehilangan jaringan terjadi, semakin pendek durasi aliran menstruasi dan apabila tertunda maka akan kehilangan darah lebih besar.

Sintesis DNA terjadi pada daerah-daerah pada lapisan basalis endometrium pada daerah antara serviks dan korpus yang telah benar-benar hilang pada hari 2-3 siklus haid, dan endometrium dalam resesus kornualis pada ostium tuba tetap intak. Hormon pada masa menstruasi berada pada titik terendah. Reseptor estrogen banyak terdapat pada lapisan basalis endometrium sehingga perbaikannya cepat dimana pada hari ke 5, 6 seluruh kavum telah . “Perbaikan” ini berlangsung cepat; pada hari 5 6, seluruh kavum telah mengalami reepitelisasi, dan pertumbuhan stroma dimulai (Firtz dan Speroff, 2005).

2) Fase proliferasi

Terjadi pertumbuhan folikel dan hanya satu yang menjadi dominan (folikel de Graff) dan sekresi estrogen meningkat. Hari pertama fase proliferasi adalah hari pertama menstruasi. Kadar estrogen yang tinggi menyebabkan jaringan endometrium yang melapisi uterus tumbuh (Heffner, 2008). Tidak diragukan lagi akibat kerja steroid ini, terjadi pertumbuhan endometrium. Semua komponen jaringan (kelenjar, sel-sel stroma, dan sel-sel endotel) menunjukkan proliferasi, kadar estradiol dalam sirkulasi mencapai puncaknya dan konsentrasi maksimal reseptor estrogen dalam endometrium pada hari 8-10 siklus. Peningkatan aktivitas mitosis dan peningkatan sintesis DNA inti dan RNA sitoplasmik merupakan tanda proliferasi (Firtz dan Speroff, 2005).

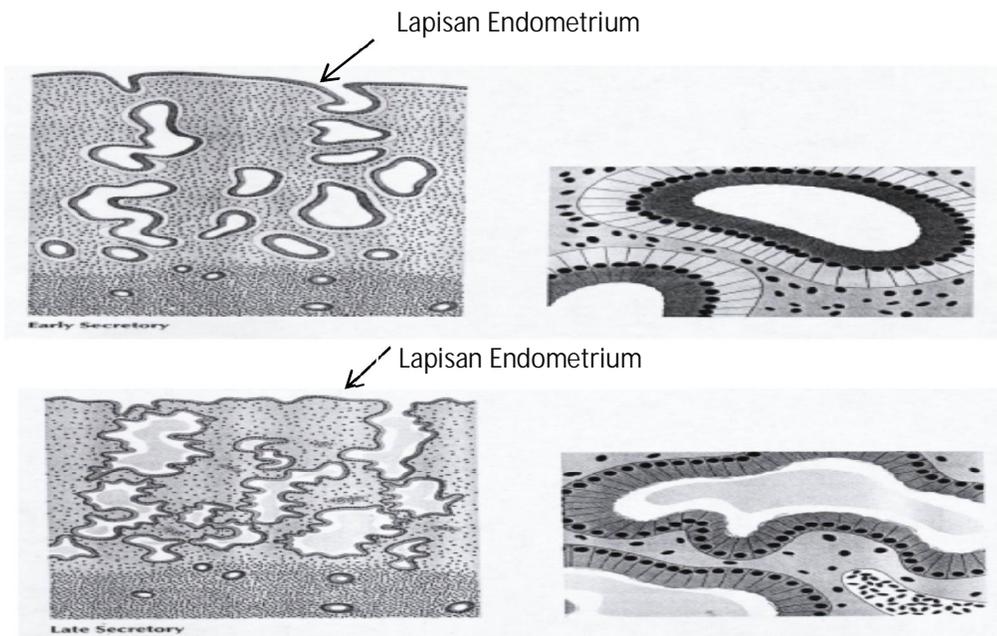
Selama proliferasi, endometrium tumbuh sekitar 0,5 mm sampai 3,5-5,0 mm. Proliferasi ini terutama terjadi pada lapisan fungsional. Pertumbuhan dan perbaikan kandungan jaringan diinduksi oleh estrogen, air, asam amino dan ion (Firtz dan Speroff, 2005).



Gambar 2.3 Endometrium pada Awal dan Akhir Fase Proliferasi
Semua komponen jaringan (kelenjar, sel-sel stroma, dan sel-sel endotel) menunjukkan proliferasi (Speroff dan Fritz, 2011).

3) Fase sekretorik

Aktivitas estrogen dan progesteron pada endometrium berkombinasi setelah ovulasi, estrogen tetap tersedia namun pertumbuhan endometrium menetap yaitu 5 - 6 mm dan proliferasi epitel berhenti pada 3 hari setelah ovulasi hal ini dianggap karena pengaruh progesteron dan penurunan mitosis dan sintesis DNA . Kelenjar berkelok-kelok disebabkan komponen jaringan tumbuh namun struktur yang terfiksasi terbatas, selanjutnya terbentuk vakuol vakuol pada 7 hari setelah ovulasi. Pada akhir fase sekretorik, kelenjar tampak kosong, permukaan sel terjadi fragmentasi seperti permukaan gigi gergaji dan lumen yang berkelok-kelok mengalami distensi. Stroma semakin edema, dan vasa spiralis tampak menonjol dan sangat terpilin-pilin (Firtz dan Speroff, 2005).



Gambar 2.4 Endometrium pada Awal dan Akhir Fase Sekretorik
Lapisan endometrium terus mengalami pertumbuhan dan berkelok-kelok (Speroff dan Fritz, 2011).

4) Persiapan implantasi

Pada hari ke7-13 setelah ovulasi (hari 21-27 siklus) terjadi perubahan bermakna yaitu kelenjar-kelenjar sekretorik berkelok-kelok, distensi sangat menonjol disertai dengan stroma. Pada 13 hari setelah ovulasi endometrium berdiferensiasi menjadi 3 zona yaitu lapisan basalis, stratum spongiosum dan stratum kompakum (Firtz dan Speroff, 2005).

5) Fase peluruhan endometrium

Pada 3 hari sebelum menstruasi terjadi perubahan pradesidua menjadi lapisan "kompakta". Tidak adanya fertilisasi, implantasi, dan tidak adanya human chorionic gonadotropin maka korpus luteum mengalami regresi, dan kadar estrogen serta progesteron menurun. Withdrawal estrogen serta progesteron mengawali kejadian endometrium penting: reaksi vasomotor, proses apoptosis, kehilangan jaringan, dan, akhirnya, menstruasi (Firtz dan Speroff, 2005)

2.1.9.2 Pengaruh DMPA terhadap endometrium

Pemakaian DMPA dapat menimbulkan efek samping seperti gangguan pola haid misalnya perdarahan yang abnormal, siklus haid yang memendek atau memanjang, perdarahan yang banyak atau sedikit, perdarahan tidak teratur atau perdarahan bercak (spotting), tidak haid sama sekali, amenore. Efek pada pola haid tergantung pada lama pemakaian yaitu perdarahan inter-menstrual dan perdarahan bercak berkurang dengan jalanya waktu, sedangkan kejadian amenorre bertambah besar. Pada pengguna DMPA yang menggunakan DMPA kurang dari 3 bulan atau 3 sampai 6 bulan banyak ditemukan mengalami spotting dan pada histologi endometrium ditemukan endometrium yang mengalami atrofi. Lima puluh persen klien mengalami amenore setelah satu tahun menggunakan DMPA. Pada penggunaan lebih dari satu tahun, tiga perempat pengguna DMPA mengalami amenore. Gangguan menstruasi merupakan alasan beberapa klien untuk menghentikan penggunaan DMPA. Efek samping awal yang tidak terprediksi membuat klien menjadi ragu. Beberapa klien menjadi takut bahwa bila mereka tidak mengalami menstruasi, maka hal tersebut pertanda kehamilan dan penyakit. Di lain pihak, beberapa klien menyukai bahwa mereka mengalami amenore, yang merupakan kebebasan yang tidak akan dirasakan sampai kemudian mereka menopause (Hartanto, 2003; Prawirohardjo, 2003; Varney et al., 2006; Simbar et al., 2007).

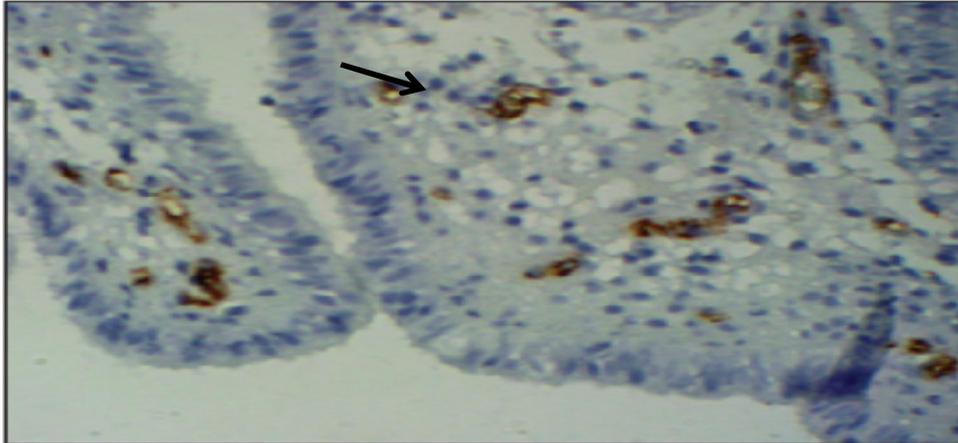
Peningkatan radikal bebas yang memicu stress oksidatif berkontribusi mekanisme gangguan perdarahan yang abnormal pada penggunaan kontrasepsi progestin jangka panjang dan menyebabkan pembesaran pembuluh darah yang abnormal pada tempat perdarahan, penipisan dan fragilitas pada dinding vaskular dan cenderung terjadi penurunan perfusi endometrium (Krikun et al., 2002; Simbar et al., 2007).

DMPA dapat menginduksi apoptosis pada sel endotel endometrium manusia, meningkatkan fragilitas vaskular dan disfungsi endotel. Sel endotel memainkan peran penting dalam pemeliharaan integritas dinding pembuluh darah dan homeostasis vaskuler. Spotting dan perdarahan yang berhubungan dengan kontrasepsi progestin disebabkan perubahan dalam integritas dinding pembuluh darah. MPA (medroxyprogesterone acetate) memiliki efek apoptosis signifikan dalam HEECs (human endometrial endothelial cells). MPA meningkatkan apoptosis dan ekspresi Bax, pro a protein apoptosis, dan penurunan Bcl-2, anti-apoptotic protein. MPA memiliki efek pada apoptosis HUVEC (human vein endothelial cells) melalui GR (glucocorticoid receptor) (Choksuchat et al., 2009; Lizarelli et al., 2009).

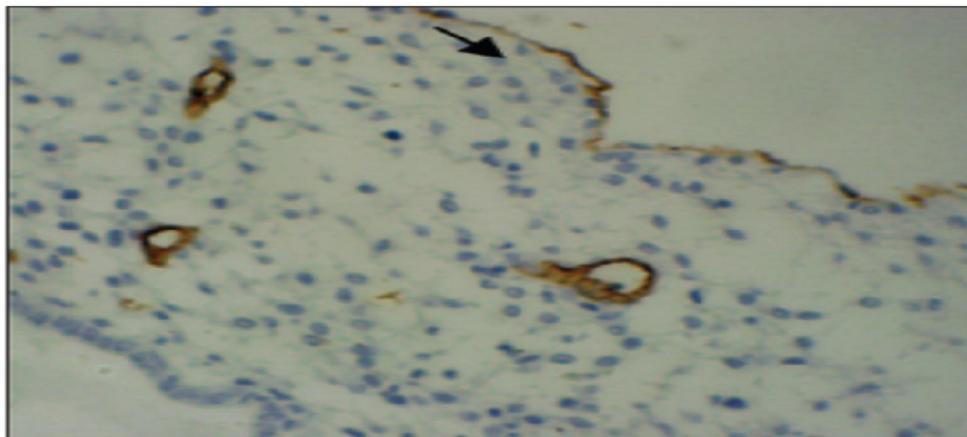
Gambaran histologi pada biopsi endometrium pengguna DMPA yang mengalami gangguan perdarahan minimal 3 bulan dan amenore minimal 3 bulan menunjukkan tidak ada perbedaan pada endometritis kronis, polip rahim, atrofi, proliferasi, atau progesteron yang dominan pada endometrium (Thurman dan Soper, 2006). Pada hasil biopsi endometrium wanita postpartum yang menggunakan DMPA ditemukan endometrium yang mengalami atrofi dan endometrium yang tidak aktif (Mishell et al., 1968; Karim et al., 1971). Hasil biopsi endometrium dari 11 pengguna DMPA di Swedia yang mengalami amenore dan menggunakan DMPA terus menerus dengan rata-rata 36 bulan menunjukkan endometrium yang atrofi (Jeppsson et al., 1977).

Pada pemakaian DMPA, endometrium menjadi dangkal dan atrofis dengan kelenjar-kelenjar yang tidak aktif. Sering stroma menjadi oedematous. Dengan pemakaian jangka-lama, endometrium dapat menjadi semakin sedikitnya, sehingga tidak didapatkan atau hanya didapatkan sedikit sekali jaringan bila dilakukan biopsi. Tetapi, perubahan-perubahan tersebut akan kembali menjadi normal dalam waktu 90 hari setelah suntikan DMPA yang

terakhir disamping itu juga DMPA membuat endometrium menjadi kurang baik/ layak untuk implantasi dari ovum yang telah dibuahi. (Hartanto, 2003)



Gambar 2.5 Histologi Endometrium pada Fase Sekretori Normal sebelum Menggunakan Kontrasepsi
Endometrium pada fase sekretori normal sebelum menggunakan kontrasepsi terlihat kerapatan dan kepadatan vaskularisasinya (HE, 200x) (Simbar, 2007)



Gambar 2.6 Histologi Endometrium setelah Dipapar DMPA
Endometrium setelah dipapar DMPA menunjukkan penurunan dalam kepadatan microvaskuler dengan bentuk epitel yang lebih tipis, dangkal dan kelenjar yang lebih kecil (HE, 200x)(Simbar, 2007).

2.2. Radikal Bebas

2.2.1 Definisi

Radikal bebas bisa terbentuk didalam tubuh yang dipicu oleh berbagai macam faktor. Radikal bebas dapat berasal dari endogenus maupun eksogenus. Radikal bebas endogenus merupakan hasil samping metabolisme normal tubuh, sedangkan radikal bebas eksogenus berasal dari lingkungan (Winarsi, 2014).

2.2.2 Tahapan Reaksi Pembentukan Radikal Bebas

Terdapat 3 tahapan yaitu Tahap inisiasi (awal pembentukan), tahap propagasi (tahap pemanjangan radikal bebas) dan terakhir adalah tahap terminasi (senyawa radikal bereaksi dengan radikal lain / menangkap radikal sehingga proses pemanjangan radikal bebas menurun)

2.2.3 Mekanisme Kerja dan Dampak Radikal Bebas

ROS (Reactive Oxygen Species) yang berlebihan akan merangsang kerusakan oksidatif pada biomolekul yang penting seperti protein, DNA, lipoprotein dan lipid sehingga menyebabkan apoptosis sel (Yazdanparast dan Ardestani, 2007). Didalam tubuh tanpa disadari secara terus menerus terbentuk radikal bebas, misalnya pada proses secara endogen seperti respirasi, proses inflamasi, radangan, dan akibat respons eksogen, seperti, radiasi sinar gamma, sinar X, radiasi ponsel, radiasi microwave, asap rokok, pendingin ruangan, obat, pestisida, limbah industri, kebakaran hutan, aktivitas vulkanik, alkohol, racun, jamur, dan makanan instan (Musarofah, 2015).

2.2.4 Efek Radikal Bebas (ROS/RNS) Terhadap Stres Oksidatif

Pada sel yang normal terdapat keseimbangan pada pro-oksidan/oksidan. Pergeseran keseimbangan pada pro-oksidan akan menyebabkan stres oksidatif yang ditunjukkan dengan peningkatan radikal bebas yang mengakibatkan terjadinya kerusakan sel (Cheeseman dan Slater, 1993).

Radikal bebas adalah molekul yang dapat menyebabkan stress oksidatif akibat ketidakseimbangan pertahanan sistem antioksidan dengan radikal bebas. ROS (Reactive Oxygen Species) yang berlebihan akan merangsang kerusakan oksidatif pada biomolekul yang penting seperti protein, DNA, lipoprotein dan lipid sehingga menyebabkan apoptosis sel (Yazdanparast dan Ardestani, 2007)

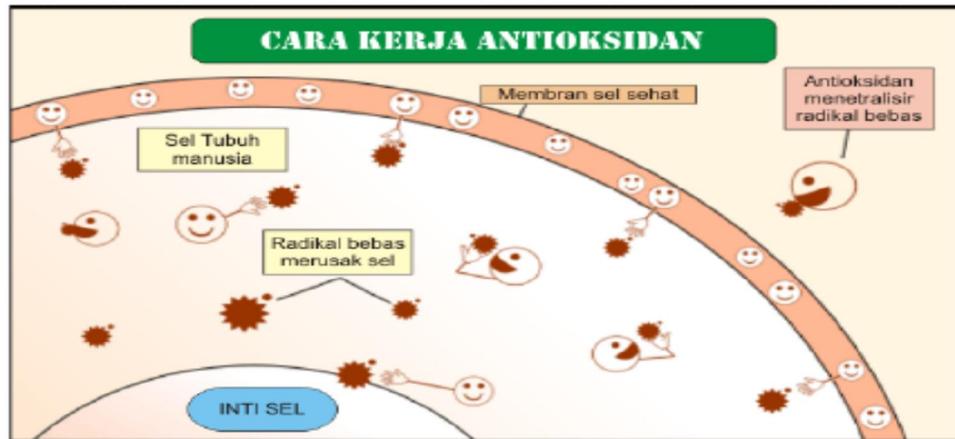
2.3 Antioksidan

2.3.1 Definisi Antioksidan

Zat yang melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul tidak stabil yang dikenal sebagai radikal bebas (Hamid et al., 2010). Selanjutnya Menurut musarofah (2015) bahwa Antioksidan adalah molekul mampu menangkal/ memperlambat oksidasi.

2.3.2 Mekanisme Kerja Antioksidan

Menangkal radikal bebas dengan cara: mencegah/ memperlambat proses oksidasi (reaksi mentrasfer elektron dari substansi ke agen lain sehingga menghasilkan radikal bebas apabila berlebihan akan merusak sel) serta menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum menyerang sel dan menetralsir radikal bebas dengan menyumbangkan elektron sehingga stabil kembali (Kalióra et al., 2006). Memberikan elektron dengan cara pengikatan oksigen dan pelepasan hidrogen (Musarofah, 2015). Menterminasi/ mengakhiri reaksi berantai yang dapat merusak sel dengan cara menangkap radikal bebas (Hamid, 2010).



Gambar 2.7 Cara Kerja Antioksidan
 Cara kerja antioksidan adalah mampu memperlambat dan menghambat oksidasi zat yang mudah teroksidasi (Krisnadi, 2015).

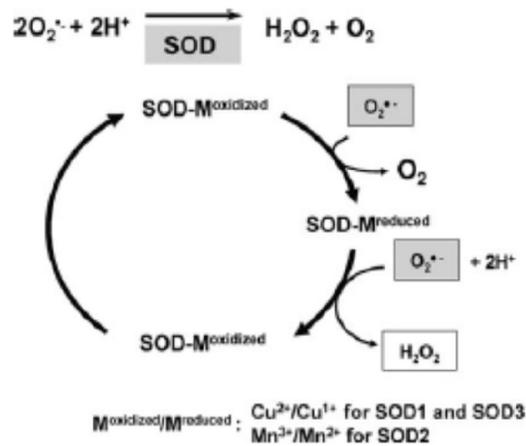
2.3.3 Jenis-Jenis Antioksidan

Atas dasar mekanisme kerjanya antioksidan dapat dibedakan menjadi (3) yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier.

- 1) Primer (Endogenus) disebut antioksidan enzimatis misalnya SOD, katalase, serta glutathion peroksidase (GSH-Px) (Winarsi, 2014; Musarofah, 2015).

SOD adalah enzim antioksidan yang bertanggung jawab untuk mengkonversi O_2^- menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2). SOD juga sebagai pelindung dari efek berbahaya dari radikal bebas seperti kerusakan DNA (Hu et al., 2005). SOD dikelompokkan menjadi 3 yaitu Cu / ZnSOD (SOD1) yang berada pada sitoplasma, MnSOD (SOD2) yang ditemukan di mitokondria, dan ecSOD (SOD3) pada ekstraseluler, yang semuanya memerlukan katalitik logam (Cu atau Mn) untuk aktivasi. Bukti terbaru menunjukkan bahwa di setiap lokasi subseluler, Semua bentuk SOD mengkatalisis konversi O_2^- menjadi H_2O_2 . Selain itu, SODs memainkan peran penting dalam mencegah disfungsi endotel dan mitokondria. SOD merupakan antioksidan endogen yang efektif dalam

melindungi dari efek stress oksidatif (Hu et al., 2005; Fukai dan Ushio-Fukai, 2011; Al-Gubory, 2012).

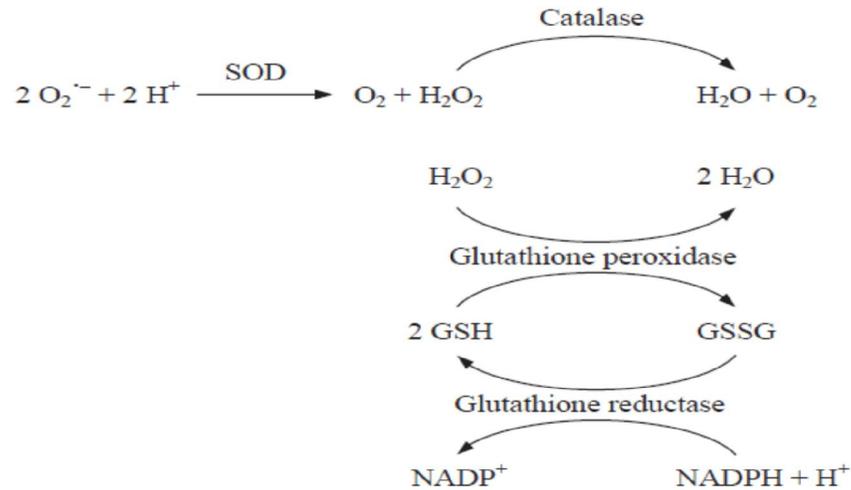


Gambar 2.8 Mekanisme secara Umum Penangkapan $\text{O}_2^{\cdot-}$ oleh SOD

Aktivasi enzim SOD melibatkan reduksi alternatif dan reoksidasi logam katalitik pada situs enzim katalitik (seperti Cu dan Mn). Cu dan Mn menjadi kunci modulator aktivitas pada SOD1/SOD3 dan SOD 2 (Fukai dan Ushio-Fukai, 2011).

SOD1 adalah SOD intraseluler yang utama (cytosolic Cu / ZnSOD). Dikenal sebagai homodimer 32kDa dan terletak terutama di sitosol dengan jumlah yang lebih kecil di Inter Membran Space (IMS) mitokondria. Metode imunohistokimia SOD1 ditemukan juga di nukleus, lisosom dan piroksisom. Pada gen manusia SOD1 terletak pada region 21q22.1 pada kromosom 21. Sedangkan SOD2 adalah mangan mitokondria (Mn) yang mengandung enzim (MnSOD), yang terdiri dari homo 96kDa tetramer dan terletak dalam matriks mitokondria. SOD3 (ekstraseluler Cu / ZnSOD/ ecSOD) adalah SOD utama dalam ruang ekstraseluler vaskuler. Dalam kebanyakan spesies, SOD3 adalah 135 kDa homotetramer terdiri dari dua dimer disulfida-linked. SOD3 terutama terletak dalam jaringan yaitu dalam matriks ekstraseluler dan pada permukaan sel dan jumlah yang lebih kecil dalam plasma dan cairan ekstraseluler. SOD3 dalam jaringan diperkirakan sekitar 90% - 99% dari

SOD3 dalam tubuh. Pada umumnya SOD3 terdapat pada jaringan pembuluh darah, paru-paru, ginjal, rahim, dan, pada tingkat lebih rendah, di dalam hati (Fukai dan Ushio Fukai, 2011). Dan Antioksidan alami yang dapat menangkal radikal bebas selain SOD adalah katalase dan GPx.



Gambar 2.9 Aktivitas Enzim Antioksidan. SOD mengkatalisis radikal superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 . Selanjutnya H_2O_2 yang toksik dirubah menjadi O_2 dan H_2O oleh katalase. GPx merubah H_2O_2 menggunakan glutation dan menghasilkan GSSH, kemudian dirubah kembali menjadi GSH oleh enzim glutathione reductase dengan dibantu NADPH (Hanukoglu, 2006).

- 2) Sekunder (Eksogenus) : antioksidan nonenzimatis bisa berasal dari komponen nutrisi atau yang lain misalnya betakaroten, asam lipoat yang dapat diperoleh dari sayuran dan buah-buahan (Winarsi, 2014; Musarofah, 2015).
- 3) Antioksidan tersier contoh enzim metionin sulfoksidan reduktase berfungsi memperbaiki DNA pada inti sel (Musarofah, 2015).

2.4 Apoptosis

2.4.1 Pengertian

Apoptosis adalah mekanisme genetik yang terprogram yang memungkinkan sel untuk bunuh diri sehingga terjadi kematian sel. Proses kematian sel sangat penting untuk kelangsungan hidup organisme banyak sel dengan menyingkirkan sel yang rusak atau terinfeksi yang dapat mengganggu fungsi normal, perkembangan dan mencegah dari transformasi onkologi (Portt et al., 2011). Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang diatur secara genetik. Sel yang apoptosis digambarkan dengan membran blebbing (pengerumbungan membran sel), menyusutan sel, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA (Renehan et al., 2001).

2.4.2 Fisiologi dan Patologis Apoptosis

Peran utama apoptosis dalam fisiologi normal adalah pada perkembangan intrauterin, seperti embriogenesis, perkembangan bentuk organ, jari tangan dan kaki. Apoptosis juga memiliki peran dalam proses biologis seperti proses penuaan, penyakit (Renehan et al., 2001). Serta berperan pada pengembangan dan fungsi sistem kekebalan tubuh (Elmore, 2007). Pada usia dewasa, sekitar 10 miliar sel-sel mati setiap hari hanya untuk menjaga keseimbangan tubuh (Renehan et al., 2001). Jumlah itu bisa meningkat secara signifikan bila ada peningkatan apoptosis selama perkembangan normal dan penuaan atau selama penyakit (Elmore, 2007). Kelainan pada regulasi kematian sel sangat berhubungan terhadap kejadian penyakit kanker, autoimmune lymphoproliferative syndrome, AIDS, iskemia dan neurodegenerative diseases seperti penyakit parkinson, Alzheimer, Huntington dan Amyotrophic Lateral Sclerosis (Elmore, 2007).

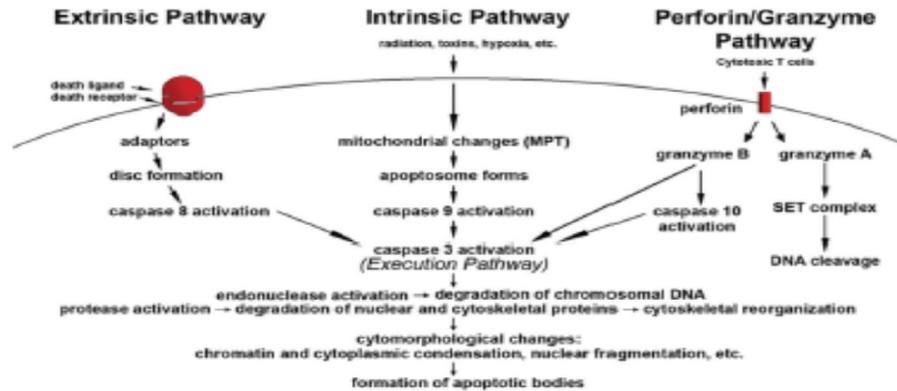
2.4.3 Proses Apoptosis

Terdapat dua jalur utama proses terjadinya apoptosis yaitu jalur ekstrinsik dan jalur instrinsik serta jalur perforin/ granzime. Jalur ekstrinsik dimulai dengan pelepasan ligan. Pada transmembran sel ligan berikatan dengan death receptor sehingga menyebabkan apoptosis kemudian membentuk trimer dan berikatan dengan FADD (Fas Associated Death Domain) yang disebut DISC (Death Inducing Signaling Complex), selanjutnya mengaktifkan pro-caspase 8 dan caspase 8 yang teraktivasi dilepaskan ke sitoplasma dan akan mengaktifasi caspase 3. Aktivasi Caspase 3 bertanggung jawab untuk pembelahan sejumlah substrat kematian yang mengarah pada keunggulan karakteristik yang populer dari apoptosis sel seperti fragmentasi DNA, fragmentasi nuklear, membran blebbing dan perubahan morfologi dan biokimia lainnya (Portt et al., 2011; CCRV Farmasi UGM).

Selanjutnya, jalur intrinsik sebagian besar berpusat disekitar mitokondria dan diatur oleh mitokondria. Apoptosis intrinsik yang paling banyak dipelajari adalah dimulai oleh stres yang memediasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD (Caspase Recruitment domain). Kemudian terbentuk apoptosom selanjutnya mengaktifasi caspase 9, selanjutnya caspase 9 mengaktifasi caspase 3 yang berfungsi memecah protein yang memelihara morfologi (gelsolin) sehingga filamen aktin dalam sel membelah dan caspase 3 juga akan mengaktifkan PAK 2 (protein untuk membentuk apoptotic body). Selanjutnya sel tersebut memberi signal "eat me" sehingga terjadi tahap fagositosis dan fagosit bisa dilakukan oleh makrofag atau sel tetangga dari sel yang mengalami apoptosis (Portt et al., 2011; CCRV Farmasi UGM).

Jalur perforin granzime dapat menginduksi apoptosis melalui granzime A dan granzime B. Granzime A mengaktifasi jalur yang berbeda dan tidak

tergantung caspase. Granzime B mengaktivasi caspase 10 selanjutnya aktivasi caspase 3 dan selanjutnya terjadi proses apoptosis seperti pada jalur ekstrinsik dan intrinsik (CCRV Farmasi UGM).



Gambar 2.10 Jalur Apoptosis

Jalur utama apoptosis adalah jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik serta jalur perforin/ granzime. Perbedaan dari jalur tersebut adalah pada jalur ekstrinsik akan mengaktivasi caspase 8, pada jalur intrinsik akan mengaktivasi caspase 9 dan pada jalur perforin/granzime akan mengaktivasi caspase 10, namun pada tahap eksekusi jalur tersebut akan bertemu pada titik yang sama yaitu pada caspase 3 teraktivasi yang menyebabkan degradasi kromosom DNA, protein-protein sitoskeletal dan inti sel, kondensasi kromatin dan sitoplasmik, fragmentasi nukleus dan selanjutnya terbentuk apoptotic body (Elmore, 2007)

2.4.4 Pemeriksaan Apoptosis

Pemeriksaan apoptosis dapat dilakukan dengan metode : (Wang, 2014)

- 1) Pengamatan dengan mikroskop cahaya
- 2) Pengamatan phosphatidylserine melalui aliran cytometri
- 3) Pemeriksaan fragmentasi DNA melalui terminal deoxynucleotidyl transferase Dntp nick-end labelling (TUNEL)
- 4) Aktivitas caspase dapat diukur melalui reaksi enzim atau substrat spesifik, ekspresi protein dengan western blotting atau kadar mRNA
- 5) Pewarnaan Annexin V Sel yang mengalami apoptosis akan mengeluarkan phosphatidylserine pada permukaan ekstraselulernya.

Phosphatidylserine pada kondisi normal terdapat di bagian dalam membran plasma yang akan keluar ke permukaan ekstraselular selama apoptosis oleh protein scramblase (Taatzjes, et al., 2008)

2.4.5 Cara Mengukur Apoptosis

- 1) Cara mengukur indeks apoptosis adalah jumlah sel yang apoptosis per 100 sel. Penelitian ini dilakukan untuk mengukur indeks apoptosis pada endometrium pasien dengan karsinoma (Kokawa et al., 2001).

$$\text{Indeks apoptosis} = \frac{\text{Jumlah sel yang apoptosis}}{100 \text{ sel}}$$

- 2) Ekspresi sel endometrium yang apoptosis dengan metode Annexin V detection pada tikus yang dipapar DMPA dianalisis dengan menghitung sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan sel nekrosis menggunakan mikroskop olympus pembesaran 400 x dengan lima lapang pandang (Veri et al., 2015)
- 3) Pemeriksaan sel yang apoptosis pada Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) dengan pewarnaan dengan Annexin V Sel diukur dengan flow cytometry (Yuan et al., 2017)
- 4) Penilaian apoptosis pada potongan jaringan hiperplasia endometrium non atipik dari hasil kuretase yang sama dengan menggunakan metode terminal deoxynucleotidyl transferasemediated deoxy-uridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay. Persentase jumlah positif sel dan sel yang mengalami apoptosis dihitung dalam 10 lapangan pandang (dengan pembesaran 40 x). Atau 20 lapangan pandang (1000x). Penilaian indeks apoptosis adalah jumlah sel apoptosis/ jumlah total sel x 100. Penelitian ini dilakukan pada jaringan (Cahyanti et al., 2009)

5) Sel yang mengalami apoptosis pada jaringan kanker payudara mencit yang dibuat blok parafin kemudian diperiksa dengan metode TUNEL, dan pemeriksaan indeks apoptosis dilakukan dengan menghitung sel yang positif pada 1000 sel yang dihitung dalam 5 lapang pandang (Nugrahaningsih dan Yuniastuti., 2014).

2.5 Kelor (*Moringa oleifera* Lamk)

2.5.1 Nama

Nama Latin : *Moringa oleifera* Lam. Nama daerah : Kelor (Sunda); marongghi (Madura); kerol (Buru) (Hidayat, 2015). Morunga adalah akar kata dari banyak nama kelor (Krisnadi, 2015).

2.5.2 Klasifikasi

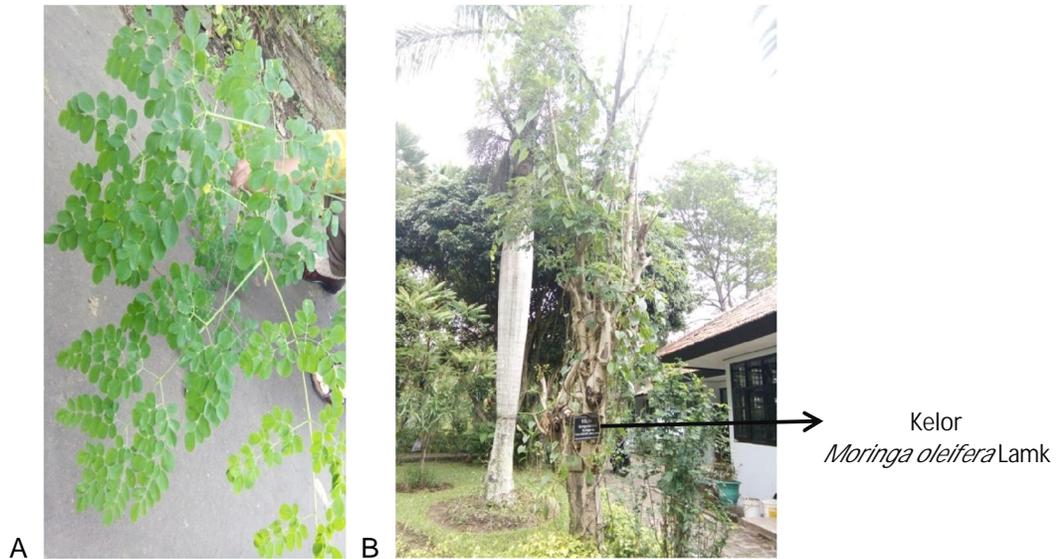
Kingdom kelor adalah plantae, Subkingdom: tumbuhan berpembuluh yang menghasilkan biji dan bunga, kelas berkeping dua atau dikotil, spesies *Moringa oleifera* Lam (Krisnadi, 2015).

2.5.3 Deskripsi Umum

Kelor mudah tumbuh meski dalam kondisi ekstrim dan berbagai kondisi lingkungan misalnya pada daerah yang panas atau bersalju. Kelor lebih suka hidup pada tanah lempung. Daun kelor biasanya dapat dipanen pada 3 sampai 6 bulan dan kelor sudah banyak dibudidayakan oleh masyarakat untuk mendapatkan daun kelor (Krisnadi, 2015).

2.5.4 Morfologi Tanaman Kelor

Tinggi pohon tanaman kelor sekitar 7-11 meter. Batang berwarna putih, tegak, permukaan kasar dan kulit tipis, memiliki daun majemuk berseling, berwarna hijau muda pada saat muda dan memiliki bunga putih kekuning-kuningan dan tudung pelepah bunganya (Hidayat, 2015).



Gambar 2.11 Daun dan Pohon Kelor

A : Daun majemuk, bertangkai panjang, tersusun berseling, beranak daun gasal, helai daun saat dewasa hijau tua, bentuk helai daun bulat telur, panjang 1 - 2 cm, lebar 1 - 2 cm, tipis lemas, ujung dan pangkal tumpul, tepi rata, susunan pertulangan menyirip, permukaan atas dan bawah halus. B : Pohon kelor mempunyai batang berkayu, kulit tipis, permukaan kasar, percabangan simpodial, arah cabang tegak atau miring, cenderung tumbuh lurus dan memanjang (Materia Medika Batu, 2017)

2.5.5 Kandungan Polifenol dalam Kelor sebagai Antioksidan

Polifenol seperti fenol dan flavonoid merupakan kandungan antioksidan potensial yang terdapat dalam daun kelor (Moyo et al., 2012; Krisnadi, 2015; Khalafalla et al., 2010). Kandungan fenol dan flavonoid dapat menangkap dan melindungi dari radikal bebas dan menghambat stres oksidatif. Senyawa ini merupakan antioksidan alami (Khalafalla et al., 2010). Flavonoid bersama-sama dengan antioksidan vitamin dan enzim berkontribusi dalam sistem pertahanan antioksidan total yaitu melindungi tubuh dari serangan kerusakan sel dan penyakit akibat stress oksidatif (Winarsi, 2014).

2.5.6 Mekanisme Kerja Polifenol dalam Daun Kelor sebagai Antioksidan

Menurut hasil survey pada beberapa penelitian bahwa kandungan antioksidan dari daun kelor yang potensial adalah polifenol misalnya fenol dan flavonoid yang dapat menangkap radikal bebas (Moyo et al., 2012; Krisnadi, 2015; Khalafalla et al., 2010). Polifenol pada daun kelor ini menunjukkan kapasitas antioksidan yang tinggi dan merupakan kelas utama antioksidan alami dan diyakini bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan pada tanaman (Lako et al., 2007; Kanatt, 2007). Polifenol potensial melindungi agen terhadap efek mematikan dari stres oksidatif, melindungi DNA dari kerusakan oksidatif, menangkal radikal bebas dan menghambat peroksida lipid / kerusakan lemak yang dapat menyebabkan apoptosis (Sestili et al., 1998; Moyo et al., 2012). Selanjutnya kandungan fenol pada ekstrak daun kelor menunjukkan aktivitas antioksidan dengan memberikan elektron yang baik dan mengakhiri reaksi berantai radikal dengan mengkonversi radikal bebas menjadi produk yang stabil (Siddhuraju dan Becker, 2003). Fenol juga mungkin berkontribusi dari kemampuan ekstrak untuk menyerap serta menetralkan radikal bebas atau mengurai peroksida (Adedapo et al., 2008). Kemampuan fenol dalam menetralkan radikal bebas karena fenol memiliki sifat reduksi dan konjugasi struktur ring dan karboksil yang dapat menghambat peroksida lipid (Oyedemi, Bradley dan Afolayan, 2010).

Flavonoid juga merupakan antioksidan sekunder, namun senyawa ini tidak kalah pentingnya dalam menginduksi status antioksidan tubuh (Winarsi, 2014). Ekstrak kelor dapat mencegah peroksida lipid dan meningkatkan enzim SOD dan CAT pada mukosa lambung tikus yang ulkus.

2.5.7 Penelitian Efek Kelor sebagai Zat Antioksidan

Berikut beberapa penelitian tentang ekstrak daun kelor yang menunjukkan efek antioksidan :

Tabel 2.1 Penelitian tentang Kelor sebagai Zat Antioksidan

Peneliti	Subyek	Perlakuan	Hasil Penelitian
Lamou et al., 2016	Tikus	Diberi ekstrak air daun kelor dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/kg selama 28 hari. Pada hari ke 28, 8 tikus dari masing-masing kelompok dipaksa berenang dan diberi beban 10% dari berat tubuhnya dan berenang selama 90 menit dengan gaya bebas	Ekstrak daun kelor mempunyai sifat antioksidan dan antifatigue dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, CAT, GPx pada semua kelompok perlakuan.
Verma et al., 2009	Tikus	Menginvestigasi potensi antioksidan dari beberapa fraksi daun kelor yang berbeda yaitu diethyl ether fraction, crude extract , chloroform/ non-phenolic fraction, ethyl acetate/ polyphenolic fraction dan aqueous/ residue fraction dengan menggunakan berbagai sistem in vitro. Selanjutnya atas dasar sistem in vitro maka fraksi yang berpotensi sebagai antioksidan digunakan untuk perbaikan kerusakan DNA and kandungan antioksidan in vivo dengan MOEF (50 dan 100mg / kg bb / hari, masing-masing tikus perlakuan, per oral) dan vit E. Selanjutnya hewan-hewan dari semua kelompok kecuali kelompok normal diberikan secara bersamaan dengan CCl ₄ : parafin cair (1: 1, 2 ml / kg bb / hari, sc) setelah 30 menit dari pemberian MOEF dan vitamin E.	MOEF atau fraksi polifenol menunjukkan sifat antioksidan yang mampu melindungi dari kerusakan oksidasi DNA yang diinduksi oleh HO [•] dan menghambat toksisitas yang dihasilkan oleh CCl ₄ seperti menurunnya lipid peroksida (LPO), peningkatan glutation (GSH), serta mengembalikan tingkat SOD dan CAT pada tingkat yang hampir normal dibandingkan dengan tikus yang terpapar CCl ₄ .

Khalafalla et al., 2010	Sel primer pasien acute lymphoblastic leukemia (ALL) dan pasien acute myeloid leukemia (AML) serta sel kultur hepatocarcinoma	Pengujian DPPH pada ekstrak etanol daun kelor, ekstrak air panas daun kelor dan ekstrak air dingin daun kelor selanjutnya menguji aktivitas terhadap leukemia dan sel hepatocarcinoma in vitro	Semua ekstrak daun kelor menunjukkan konsentrasi Aktivitas menangkal radikal dengan menggunakan uji 2, 2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH). ekstrak etanol daun kelor memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu 77%, selanjutnya ekstrak air panas daun kelor : 68% dan ekstrak air dingin daun kelor 49% dan berpotensi untuk digunakan sebagai sumber pengobatan alami untuk penyakit seperti kanker.
Sreelatha dan Padma, 2009	Model in vitro	Menguji ekstrak air daun kelor dengan uji DPPH untuk aktivitas penangkal radikal bebas, uji penangkal superoksida radikal, uji penangkal radikal nitrit oksida dan peroksidasi lipid	ekstrak air kelor baik daun matang dan daun muda memiliki aktivitas antioksidan yang sebanding dan hanya berbeda sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kelor dapat menangkal radikal bebas, kerusakan biomolekul dan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif.
Sidduraju dan Becker, 2003	Daun Kelor	Pengujian DPPH pada ekstrak air, methanol, etanol daun kelor	Semua ekstrak air, methanol, etanol daun kelor memiliki aktivitas antioksidan dan menangkal radikal bebas.

2.6 Rattus norvegicus

Pada pemilihan hewan coba harus tepat dan sesuai dengan penelitian yang diambil, seperti pemilihan strain, jenis kelamin, berat badan dan umur. Terdapat beberapa jenis hewan yang sering dipakai oleh peneliti digunakan mislanya tikus, mencit, kelinci dan kera (Syamsudin dan Darmono, 2011). Tikus merupakan hewan yang sering digunakan sebagai tikus percobaan. Tikus yang sering digunakan sebagai hewan coba adalah spesies *Rattus norvegicus* (Estina, 2011)



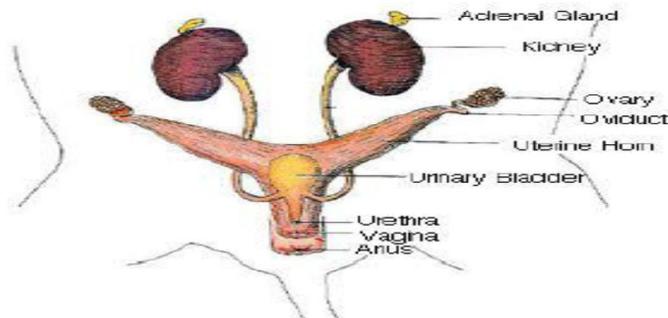
Gambar 2.12 *Rattus norvegicus* wistar

Tikus wistar memiliki kepala lebar, telinga panjang, dan memiliki ekor panjang (tidak melebihi panjang tubuhnya) (Estina, 2011).

Tikus dijadikan hewan penelitian karena termasuk hewan mamalia, apabila tikus dijadikan hewan penelitian dan diberikan perlakuan maka dampaknya mungkin tidak jauh berbeda dengan mamalia lainnya misalnya untuk uji toksisitas, obat-obatan, metabolisme, embriologi dan tingkah laku (Malole dkk., 1989).

Menurut Sowash (2009) *Rattus norvegicus* masuk dalam klasifikasi kingdom animal, kelas mamalia, genus *rattus* dan spesies *norvegicus*. Keunggulan tikus dari pada mencit adalah ukuranya lebih besar, mudah dipegang. Tikus tidak mempunyai kelenjar, empedu, dengan lambung terbagi menjadi dua yaitu non-glandular dan glandular, tidak pernah muntah karena memiliki usus halus (duodenum, jejunum dan ileum) (Kusumawati, 2004). Uterus pada tikus betina berupa tabung ganda, disebut tipe dupleks (Sowash, 2009; Partodiharjo, 1992). Dinding uterus terdiri dari 3 lapisan, yaitu lapisan endometrium (lapisan dalam), lapisan miometrium (lapisan tengah) dan lapisan perimetrium (lapisan terluar) (Burkitt et al., 1999). Disamping itu kelebihan tikus dari pada mencit adalah tikus banyak digunakan untuk penelitian kesehatan, fisiologi tikus lebih menyerupai kondisi manusia, dan memiliki ukuran yang sesuai pada bagian struktur organ sehingga mempengaruhi efek dari pemberian obat ke

daerah anatomi tertentu dan hal ini sangat penting dalam sistem saraf pusat (Iannaccone dan Jacob, 2009).



Gambar 2.13 Organ Reproduksi Tikus Betina

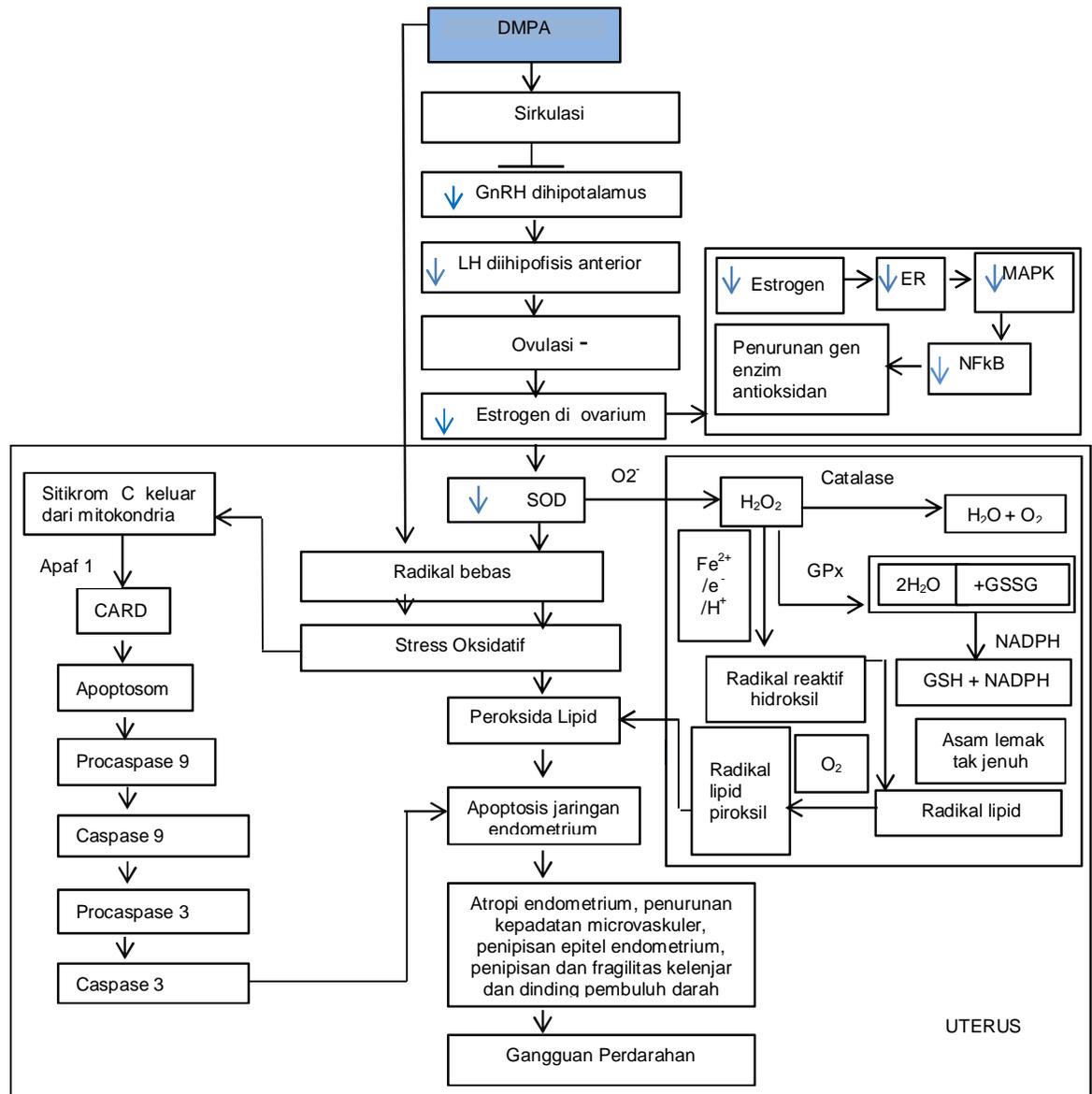
Organ reproduksi tikus betina meliputi vagina yang terletak dibelakang kandung kemih. Uterus terdiri dari dua tanduk uterus dan pada ujung tanduk rahim disebut ovarium, yang terhubung ke tanduk uterus melalui saluran telur (Sowash, 2009)

Siklus reproduksi tikus betina disebut siklus estrus dan ditandai sebagai proestrus, estrus, metestrus (atau diestrus I) dan diestrus (atau diestrus II). Ovulasi terjadi mulai awal proestrus sampai akhir estrus, rata-rata panjang siklus tikus betina adalah 4 hari dan siklus pendek dan panjang membuat tikus menjadi binatang ideal untuk investigasi perubahan yang terjadi selama siklus reproduksi. Selama siklus estrus, prolaktin, LH dan FSH tetap rendah dan meningkat pada sore hari fase proestrus. Tingkat estradiol mulai meningkat pada metestrus dan mencapai tingkat puncak selama proestrus dan menurun kembali pada fase estrus. Tingkat progesteron juga meningkat selama metestrus dan diestrus dan kemudian terjadi penurunan setelah itu. Selanjutnya sekresi progesteron meningkat dan mencapai puncak pada dua hari menjelang akhir proestrus. Dari hasil olesan vagina pada fase proestrus didominasi sel epitel berinti, pada fase estrus terutama terdiri dari sel menanduk tanpa inti, fase metestrus terdiri dari jumlah yang sama antara leukosit, sel menanduk (cornified), dan sel-sel epitel berinti dan fase diestrus terutama terdiri dari leukosit (Marcondes et al., 2002).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1. Kerangka Teori Penelitian

Keterangan :

- : Efek DMPA
- : Efek ekstrak air daun kelor
- : Mempengaruhi
- | : Menghambat

Kontrasepsi DMPA dalam sirkulasi mempunyai mekanisme menghambat pelepasan GnRH sehingga akan menstimulasi LH dalam kadar rendah. LH yang rendah menyebabkan ovulasi tidak terjadi, karena ovulasi dihambat maka kadar progesteron dalam serum tetap 0,4 ng/ml selama beberapa bulan. Apabila kadarnya turun <0,1 ng/ml maka ovulasi akan terjadi. Estradiol rata 50 pg/ml pada fase mid folikuler dini setelah penyuntikan DMPA. Kadar estradiol serum mulai meningkat 4 bulan setelah 1 kali suntikan DMPA, ketika kadar DMPA turun 0,5 ng/ml. Namun pada wanita yang telah menggunakan DMPA selama beberapa tahun, kadar serum estradiol bisa mencapai level terendah hingga 10 pg/ml.

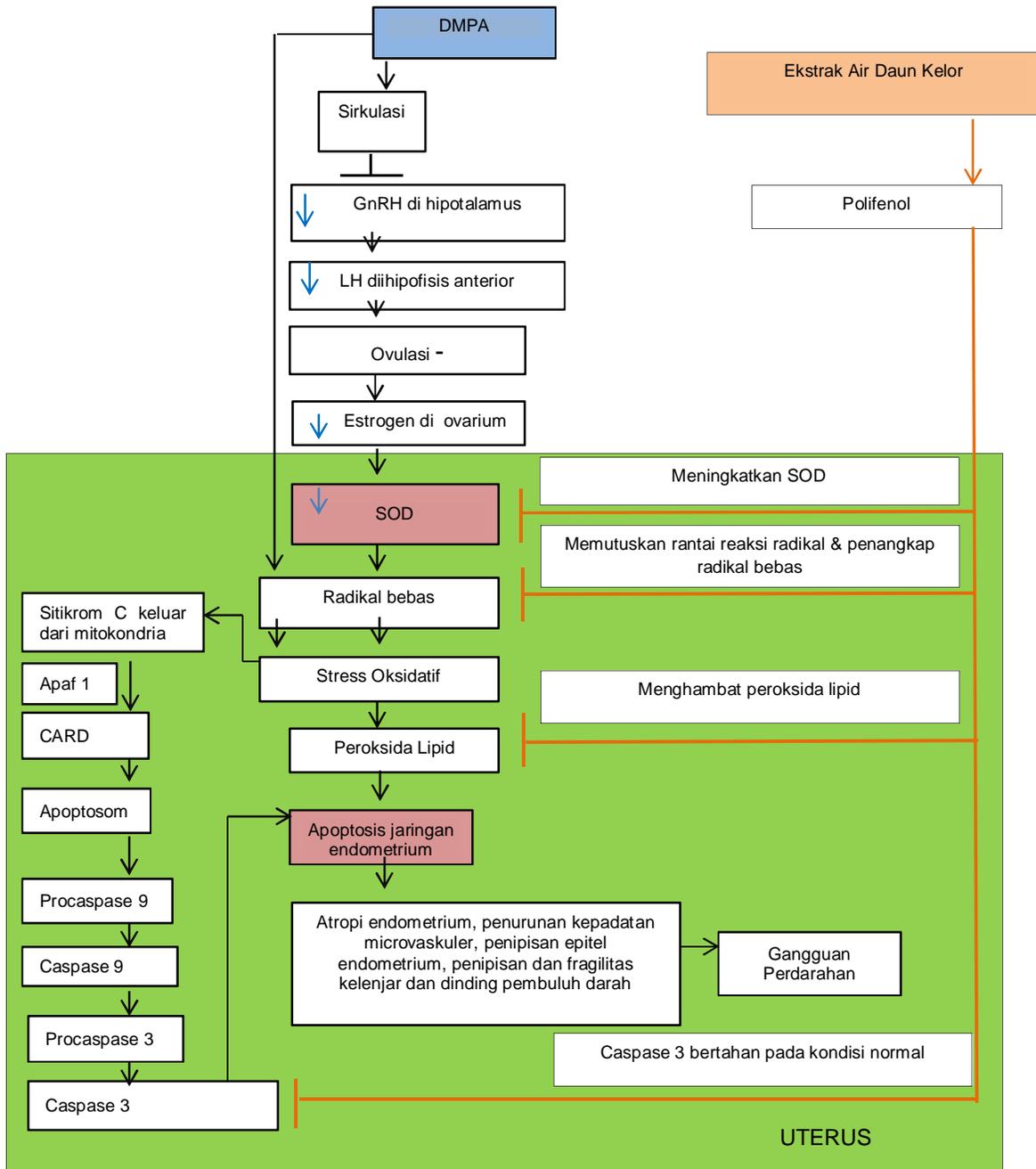
Jumlah estrogen yang rendah akan mempengaruhi terhadap enzim antioksidan alami dalam tubuh, apabila jumlah estrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen rendah, maka akan menurunkan aktivasi sejumlah jalur sinyal, intraseluler khususnya MAPK jalur yang mengarah ke fosforilasi dan dengan demikian terjadi penurunan aktivasi NFkB sehingga aktivasi transkripsi dari gen seperti GPx atau SOD menurun. Defisiensi estrogen dapat menurunkan kadar SOD dan GPx serta meningkatkan Peroksidasi Lipid (LPO) dan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) serta dapat meningkatkan kerentanan terhadap perubahan oksidatif yang disebabkan oleh H_2O_2 (Hidrogen peroksida). Penurunan kadar SOD akan meningkatkan radikal bebas sehingga terjadi peningkatan stress oksidatif dan peningkatan peroksida lipid yang menyebabkan apoptosis pada jaringan endometrium sehingga terjadi gangguan perdarahan.

DMPA adalah kontrasepsi progestin dan penggunaan kontrasepsi progestin dapat menghambat estrogen dan kemampuan 17β -estradiol (E2) dan penurunan jumlah reseptor estrogen dan mengganggu aktivitas/ekspresi MnSOD. Penurunan tingkat SOD dan akumulasi radikal superoksida akan menyebabkan kematian sel apoptosis karena SOD dapat menjaga sel – sel dengan mengubah radikal superoksida menjadi O_2 dan H_2O_2 . Kemudian H_2O_2

yang toksik akan diuraikan menjadi O_2 dan H_2O oleh katalase. GP_x mengkatalisis reduksi hidroperksida oleh glutation. Apabila H_2O_2 bereaksi dengan $Fe^{2+}/e^-/H^+$ maka akan menjadi radikal bebas (radikal reaktif hidroksil/reaksi Fenton). Radikal reaktif hidroksil yang bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda akan membentuk Radikal lipid (R^\cdot) dan Radikal lipid (R^\cdot) yang bereaksi dengan molekul oksigen akan berubah menjadi radikal lipid peroksil (ROO^\cdot). Apabila ROO^\cdot tidak direduksi oleh antioksidan, maka akan terjadi proses peroksidasi lipid. DMPA dapat menginduksi apoptosis pada jaringan endometrium selama suntikan pertama dan kedua pada akseptor yang menggunakan DMPA hal ini terlihat dari histologi endometrium yang atrofi, penurunan kepadatan microvaskuler, penipisan epitel endometrium, penipisan dan fragilitas kelenjar dan dinding pembuluh darah sehingga menimbulkan gangguan perdarahan.

Pemakaian DMPA jangka panjang dapat menyebabkan akumulasi radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif dalam sel endometrium secara langsung menimbulkan nonspesifik inner membrane permeability transition pore terbuka sehingga c keluar ke sitoplasma. Sitokrom c yang keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD (Caspase Recruitment domain). Beberapa CARD bergabung membentuk apoptosome kemudian mengikat procaspase 9 dan mengaktifkannya menjadi caspase 9 selanjutnya caspase 9 mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3. Caspase 3 memecah gelsolin yang merupakan protein untuk memelihara morfologi sel. Gelsolin yang terpecah kemudian membelah filamen aktin di dalam sel. Caspase 3 juga mengaktifkan PAK 2 (p21 activated kinase 2) terbentuklah apoptotic body sehingga terjadi apoptosis.

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- ↓ : Efek DMPA
- ↑ : Efek ekstrak air daun kelor
- : Mempengaruhi
- | : Menghambat
- : Yang diteliti

DMPA dalam sirkulasi mempunyai mekanisme kerja menekan pelepasan GnRH dari hipotalamus dan akan mensupresi LH surge pre-ovulatori, sehingga menghambat terjadinya ovulasi akibat tidak terjadi LH surge. Pada penggunaan DMPA selama beberapa tahun, kadar serum estradiol bisa mencapai level terendah hingga 10 pg/ml. Penggunaan DMPA dalam jangka waktu yang lama dapat meningkatkan radikal bebas dan menimbulkan stres oksidatif pada sel endometrium dan menimbulkan nonspesifik inner membrane permeability transition pore terbuka sehingga sitokrom c keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD. Beberapa CARD bergabung membentuk apoptosome kemudian mengikat procaspase 9 dan mengaktifkannya menjadi caspase 9 selanjutnya caspase 9 mengaktifkan procaspase 3 menjadi caspase 3. Caspase 3 yang merupakan caspase efektor yang melaksanakan apoptosis. Jumlah estrogen yang rendah akan menyebabkan turunya kadar SOD sehingga memicu terjadinya peningkatan radikal bebas. Radikal bebas yang berlebihan menyebabkan stres oksidatif yang mengakibatkan peningkatan peroksida lipid dan menyebabkan apoptosis pada jaringan endometrium dan atrofi endometrium, penurunan kepadatan microvaskuler, penipisan epitel endometrium, penipisan dan fragilitas kelenjar dan dinding pembuluh darah yang berkontribusi pada mekanisme gangguan perdarahan.

Ekstrak air daun kelor memiliki kandungan polifenol yang larut dalam air karena berikatan dengan gula dan mempunyai sifat antioksidan dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, CAT, GPx, dapat menangkal radikal bebas, kerusakan biomolekuler dan perlindungan terhadap kerusakan oksidatif, memutus rantai pembentukan peroksida lipid pada tahap inisiasi dan propagasi serta sebagai antiapoptosis melalui kadar caspase-3 yang bertahan pada kondisi normal sehingga terlindungi dari apoptosis atau kematian sel.

3.3 Hipotesis penelitian :

Ekstrak air daun kelor mempengaruhi kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

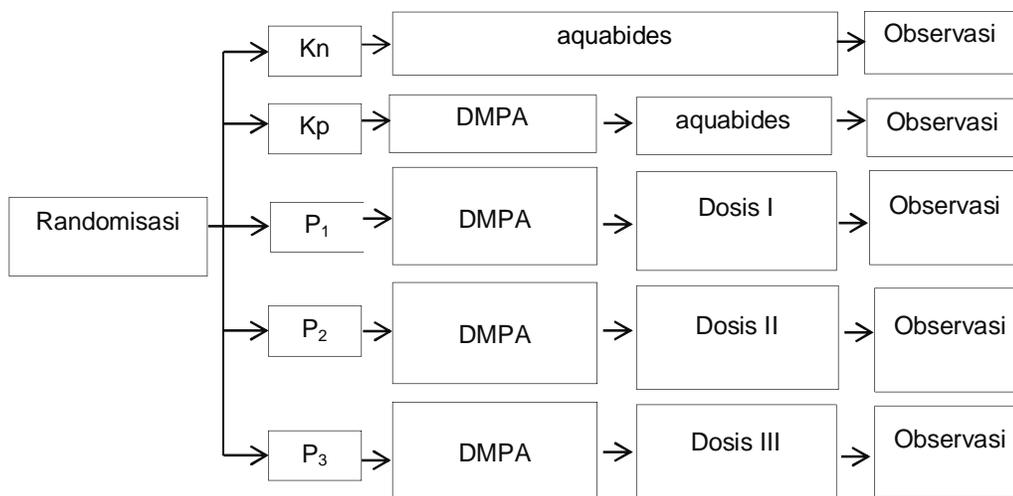
Sub hipotesis penelitian ini adalah :

- 1) Ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 2) Ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 3) Ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 4) Ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 5) Ada hubungan antara kadar SOD uterus dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan true experimental dan pendekatan post test only control group design. Dalam desain ini untuk penentuan sampel dilakukan secara random. Selanjutnya kelompok kontrol negatif disuntik aquabides dan diberi aquabides secara oral, kelompok kontrol positif dipapar DMPA dan diberi aquabides secara oral, kelompok perlakuan 1 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dosis 100 mg/kg BB/hari, kelompok perlakuan 2 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dosis 150 mg/kg BB/hari dan kelompok perlakuan 3 dipapar DMPA dan ekstrak air kelor dengan dosis 200 mg/kg BB/hari.



Gambar 4.1 Skema Desain Penelitian

Keterangan :
Kn : Kelompok kontrol negatif
Kp : Kelompok kontrol positif
P₁ : Kelompok perlakuan 1
P₂ : Kelompok perlakuan 2
P₃ : Kelompok perlakuan 3

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

- 1) Di Matera medika Kota Batu, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur untuk memperoleh bahan alam daun kelor yang berbentuk simplisia
- 2) Di Laboratorium Fisiologi Hewan untuk melakukan freeze dryer ekstrak air daun kelor.
- 3) Di Laboratorium farmasi untuk mengetahui kandungan fitokimia ekstrak air daun kelor seperti polifenol.
- 4) Di Laboratorium MIPA kimia untuk mengetahui kadar fenol ekstrak air daun kelor.
- 5) Di Laboratorium analisis instrumentasi POLINEMA untuk mengetahui total flavonoid dengan QuE (quercetin equivalent) ekstrak air daun kelor.
- 6) Di laboratorium parasitologi untuk pemeliharaan hewan coba dan eksekusi organ endometrium dilakukan
- 7) Di Laboratorium Patologi Anatomi untuk pembuatan preparat histologi
- 8) Di Laboratorium Biomedik untuk pemeriksaan SOD dan Indeks Apoptosis

Tempat pemeriksaan SOD dan indeks apoptosis dilakukan

4.2.2 Waktu Penelitian

3 bulan terhitung sejak April sampai juli 2017

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Kriteria Pengambilan Sampel

Tikus putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) sebagai hewan coba, sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

4.3.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Tikus usia 9-12 minggu dengan berat 120-150 gram, jenis kelamin betina, kondisi sehat dan bergerak aktif masuk dalam kriteria penelitian sedangkan apabila tikus tampak sakit sebelum/ selama perlakuan dan hewan coba mati saat penelitian berlangsung akan dikeluarkan..

4.3.3 Besar sampel

Dalam solimun (2001) disebutkan, rumus besar sampel ditentukan atas dasar banyaknya pengulangan pada kelompok perlakuan sebagai berikut :

Rumus :

$$p (n-1) = 15$$

$$5 (n-1) = 15$$

$$n = 4$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan pada tiap kelompok perlakuan

Besar replikasi dalam penelitian ini adalah 6 tikus, sehingga besar sampel yang digunakan adalah 30 tikus.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

Variabel independen : pemberian ekstrak air daun kelor, sedangkan variabel dependen : kadar SOD dan indeks apoptosis sel di endometrium.

4.4.2 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala Data
1	Independent			
	a. Ekstrak air daun kelor	Simplisia Daun kelor diperoleh dari materia medika Kota Batu, Malang. Pemberian ekstrak air daun kelor pada berbagai dosis yaitu dosis 100, 150 dan 200 mg/kg BB/hari dan diberikan secara oral dengan menggunakan sonde pada tikus selama 28 hari	Dengan cara menimbang dan melarutkan ekstrak air daun kelor (Lamau et al., 2016)	Rasio
2	Dependen			
	a. SOD	Besarnya konsentrasi enzim SOD sebagai salah satu enzim antioksidan endogen yang diukur dari sampel uterus tikus wistar yang diterminasi setelah 28 hari perlakuan dengan injeksi DMPA dan pemberian ekstrak air daun kelor.	Colorymetry dengan membandingkan Optikal Density (OD) sampel dengan kurva standar. Hasil yang didapatkan pada kadar SOD dinyatakan dalam U/mL (Cayman, 2014)	Rasio
	b. Indeks Apoptosis	Pengamatan apoptosis pada jaringan endometrium, Jaringan yang apoptosis dihitung dengan program immunoratio pembesaran 1000 dengan 20 lapang pandang	Immunohistokimia (Roche, 2004)	Rasio

4.5 Aklimatisasi dan Pemeliharaan tikus

Aklimatisasi tikus dilakukan selama 1 minggu dengan tujuan mengkondisikan tikus dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stress. Pada waktu aklimatisasi tikus diberikan makan dan minum dengan pakan standar diberikan sebanyak 40 gram/ hari/ ekor satu kali sehari jam 16.00 WIB. Tikus ditempatkan pada kandang dengan suhu kamar 20-25⁰C yang tampak dari luar dengan ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang telah dialasi sekam padi setebal 0,5-1 cm dan setiap 2 hari sekali sekam diganti.

4.6 Prosedur Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor

4.6.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut.

4.6.2 Bahan

Simplisia daun kelor yang diperoleh dari Materia medika Kota Batu, Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur.

4.6.3 Alat

Kompas, panci, air, corong gelas, gelas ukur, timbangan, kain saring, tempat simplisia daun kelor dan botol tempat ekstrak air daun kelor

4.6.4 Prosedur Ekstraksi Air Daun Kelor

Pembuatan ekstraksi air daun kelor dilakukan oleh peneliti dengan menyiapkan 170 gram simplisia daun kelor direndam pada 1,7 liter air 70⁰ C selama 1 jam kemudian disaring. Kemudian dilakukan freeze dryer pada ekstrak air daun kelor di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya.

4.6.5 Pembuatan Sediaan Ekstrak Air Daun Kelor

Pembuatan sediaan ekstrak air daun kelor didasarkan dengan berat badan tikus rata-rata yang ditimbang setiap seminggu sekali. Jika Berat Badan tikus 150 mg, maka sediaan ekstrak air daun kelor :

- 1) Dosis I = 100 mg $\rightarrow 100 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 15 \text{ mg}$
- 2) Dosis II = 150 mg $\rightarrow 150 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 22,5 \text{ mg}$
- 3) Dosis III = 200 mg $\rightarrow 200 \text{ mg} \times 150 \text{ gram} / 1000 = 30 \text{ mg}$

Membuat larutan stok 50 mg/ml dengan menimbang 5 gram ekstrak air daun kelor dilarutkan dalam 100 ml aquabides. Selanjutnya membuat larutan dengan konsentrasi sesuai dengan kebutuhan yaitu 15 mg/ ml, 22,5 mg/ml, 30 mg/ ml.

- 1) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis I = konsentrasi 15 mg/ ml :
 $10 \times 15 / 50 = 3 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 7 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.
- 2) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis II = konsentrasi 22,5 mg/ml :
 $10 \times 22,5 / 50 = 4,5 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 5,5 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.
- 3) Untuk membuat ekstrak air daun kelor dosis III = konsentrasi 30 mg/ ml :
 $10 \times 30 / 50 = 6 \text{ ml}$ stok dengan ditambah 4 ml aquades = 10 ml. 1 tikus diberi 1 ml.

4.7 Injeksi DMPA

DMPA dengan dosis 150 mg (3 ml) diencerkan dengan aquabidest sebanyak 7 ml, diaduk agar homogen. Lalu diambil 0,2 ml (2,7 mg) untuk diinjeksikan pada masing-masing kelompok perlakuan (kontrol positif, perlakuan 1,2,3) (Susilawati et al., 2015) . DMPA diberikan pada awal minggu bersamaan dengan pemberian ekstrak air daun kelor.

4.8 Prosedur terminasi

Tikus diterminasi dengan cara diinjeksikan ketamin sebanyak 80 mg/kg BB dan ditunggu beberapa menit sampai tikus benar-benar mati (tidak bergerak lagi).

4.9 Pengambilan Organ Uterus

4.9.1 Bahan dan Alat :

Bahan : Gunting, pinset, NaCl 0,9 %, PBS pH 7,4 dan formalin 10%

4.9.2 Prosedur Pengambilan Organ Uterus

- 1) Meletakkan tikus yang sudah mati diatas papan dengan perut menghadap ke atas (Terfiksasi dengan baik). Tikus ditempatkan pada atas papan dengan menggunakan jarum pentul yang ditancapkan pada keempat telapak kaki.
- 2) Membuka dinding perut dengan menggunakan gunting dan pinset secara hati-hati dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan kesamping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah dan diafragma dibuka. Setelah itu uterus dibuka dengan hati-hati dengan cara menggunting tepat pada bagian isthmus tuba fallopi kiri dan kanan dan pada bagian bawah (batas antara servik dan uterus)
- 3) Kemudian uterus dibersihkan dari seluruh ligamen yang melekat. Selanjutnya uterus dibersihkan dari darah menggunakan aquabides tiriskan organ menggunakan kertas saring dengan satu kali tekanan.
- 4) Setelah air pada organ mulai mengering, uterus dipisahkan antara tandur uterus kanan dan kiri.

- 5) Kemudian masukkan tandur uterus kanan kedalam klip plastik kemudian ditimbang untuk selanjutnya menguji kadar SOD dan masukkan tandur uterus kiri dalam botol yang berisi fixative buffer formalin 10% dan direndam selama 12-24 jam untuk menguji indeks apoptosis.
- 6) Bagian tandur uterus kanan siap untuk dilakukan uji kadar SOD dan bagian tandur uterus kiri diproses menjadi preparat di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya yang selanjutnya untuk menguji indeks apoptosis.
- 7) Bangkai tikus dikubur dengan kedalaman 0,5 meter.

4.10 Prosedur SOD

4.10.1 Persiapan Bahan dan Alat

Superoxide Dismutase Assay Kit, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, sukrosa dan sentrifuse

4.10.2 Menghomogenkan Jaringan

- 1) Jaringan dibilas dengan phosphate buffered saline (PBS) dengan pH 7.4) untuk menghilangkan sel darah merah, endapan atau gumpalan.
- 2) Homogenisasi dalam 5-10 ml/ gram jaringan pada buffer HEPES (dingin) konsentrasi 20 mM. pH 7,2 yang mengandung 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, dan 70 mM sukrosa.
- 3) Lalu disentrifus selama 5 menit dengan 1500xg pada 4°C.
- 4) Supernatan diambil untuk pengujian dan apabila supernatan tidak dilakukan pengujian segera maka disimpan dalam -80°C. Sampel akan tetap stabil dalam waktu 1 bulan.

4.10.3 Reagen Preparation

1) Assay Buffer

8 ml assay buffer 10x + 27 ml HPLC grade water



30 ml diluted assay buffer

2) Sampel Buffer

2 ml sampel buffer 10x + 18 ml HPLC grade water



20 ml diluted sampel buffer

3) Radical detector

50 ml stock + 19,95 ml diluted assay buffer



20 ml diluted radical detector

4) SOD standart

20 µl SOD standart + 1,98 ml sampel buffer



2 ml SOD stock solution

5) Xantine Oxidase

50 ml stock + 1,95 ml sampel buffer



2 ml diluted xantine oxidase

4.10.4 SOD Asssay

- 1) Untuk membuat standard Well SOD tambahkan 200 µl Radikal Detector yang telah diencerkan dan 10 µl pada standard (tabung A-G) pada tiap well.
- 2) Untuk membuat sampel well, tambahkan 200 µl Radikal Detector yang telah diencerkan dan 10 µl pada sampel tiap well.

- 3) Reaksi dimulai dengan menambahkan 20 µl Xanthine Oxidase yang telah diencerkan untuk semua well yang digunakan. Pastikan untuk mencatat waktu yang tepat pada saat memulai dan menambahkan Xanthine Oxidase secepat mungkin.
- 4) Kocok 96 well plate dengan hati-hati selama beberapa detik dalam mencampur. Tutup dengan penutup plate.
- 5) Inkubasi plate pada shaker selama 20 menit pada suhu kamar. Baca absorbansi pada 440-460 nm menggunakan plate reader.

4.11 Posedur Pengerjaan Preparat

- 1) Proses pemotongan jaringan berupa makross
Jaringan atau Spesimen Penelitian harus sudah terfiksasi dengan formalin 10 % atau dengan bafer formalin 10 % minimal selama 7 jam sebelum dilakukan proses pengerjaan berikutnya kemudian jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan lokasi yang akan di teliti. Jaringan di potong kurang lebih ketebalan 2-3 mili meter kemudian di masukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti. Jaringan kemudian diproses dengan alat Automatik Tissue Tex Prosesor atau dengan cara manual. Standar di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB menggunakan Automatik Tissue Tex Prosesor selama 90 Menit dan alarm bunyi tanda selesai.
- 2) Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan
Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor, kemudian jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan dan jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron.
- 3) Proses deparafinisasi
Setelah di sayat atau di potong dengan ketebalan 3-5 mikron, di taruh dalam oven selama 30 Menit dengan suhu panas 70-80

drajat , kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan xilol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.

4.12 Pemeriksaan Indeks Apoptosis

4.12.1 Kit, Bahan dan Alat

Kit TUNNEL Apoptosis, Xylene dan etanol, PBS dan Pro K

4.12.2 Prosedur Pemeriksaan Indeks Apoptosis

1) Deparafinasi

Slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian direndam dalam larutan-larutan dibawah ini secara berurutan : xilol (2 x 10 menit), etanol absolut (2 x 10 menit), etanol 90 % (1 x 5 menit), etanol 80 % (1 x 5 menit), etanol 70% (1 x 5 menit) dan aquades steril (3 x 5 menit).

2) Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat : rendam slide kemudian keluarkan dan cuci slide

3) Immunohistokimia

a. Cuci PBS 3 X 5 menit

b. Berikan Pro-K dalam Tris HCL PH 7,4 selama 25 menit dengan suhu 37°C

c. Cuci PBS 3 x 5 menit

d. Berikan Tunnel reaction mixture

e. Inkubasi 60 menit dalam suhu 37°C dalam gelap.

f. Cuci PBS 3 x 5 menit

g. Berikan converter POD 50 µl selama 30 menit dalam suhu 37°C

h. Cuci PBS 3 x 5 menit

i. DAB substrat 3 menit

- j. Cuci aquabides
- k. Berikan mayer 2 menit
- l. Maunting

4.13 Analisis Data

Teknik analisa data yang dilakukan yaitu uji normalitas data sampel dengan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Uji homogenitas ragam, menggunakan uji Levene. Uji statistik yang digunakan untuk uji beda adalah Anova One Way (uji F) apabila data terdistribusi normal dan homogen atau uji Kruskal Wallis apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen

4.13.1 Uji Prasyarat Parametrik

Data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data terdistribusi normal dan homogen. Uji normalitas data dalam penelitian ini digunakan uji Shapiro-Wilk jika nilai Sig menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikan $\alpha = 0,05$ (Santoso, 2005). Uji homogenitas ragam yang digunakan adalah uji Levene. Jika nilai Sig atau p-value menunjukkan nilai yang lebih besar 0,05, maka disimpulkan data homogen sehingga dapat dilakukan uji parametrik (Dahlan, 2015).

4.13.2 Uji Anova One Way

Digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara K+ dengan P1, P2, P3. Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data kadar SOD dan indeks apoptosis. Tujuannya untuk mengetahui ada atau tidak ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis pada endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA. Jika pada uji Anova One Way ini menghasilkan kesimpulan ada perbedaan pengaruh signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda yaitu Least Significant Difference/ LSD (Steel dan Torrie, 1995). Dengan tujuan untuk

menemukan dosis ekstrak air daun kelor yang paling berpengaruh terhadap kadar SOD dan indeks apoptosis pada tikus wistar.

4.13.3 Uji Pearson Product Moment

Uji Pearson Product Moment adalah uji korelasi yang digunakan pada data penelitian yang berdistribusi normal dan homogen. Kriteria pengambilan keputusannya adalah apabila nilai signifikansi $\leq 0,05$ artinya ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan kadar SOD dan indeks apoptosis pada endometrium tikus wistar yang dipapar DMPA. Untuk uji korelasi, setelah dilakukan uji statistik, selain dilihat nilai signifikansi, maka perlu dilihat koefisien korelasi untuk melihat kekuatan hubungan antara kedua variabel serta ditentukan arah hubungannya. Nilai korelasi berkisar antara 0 sampai dengan 1, dan dapat bernilai positif maupun negatif.

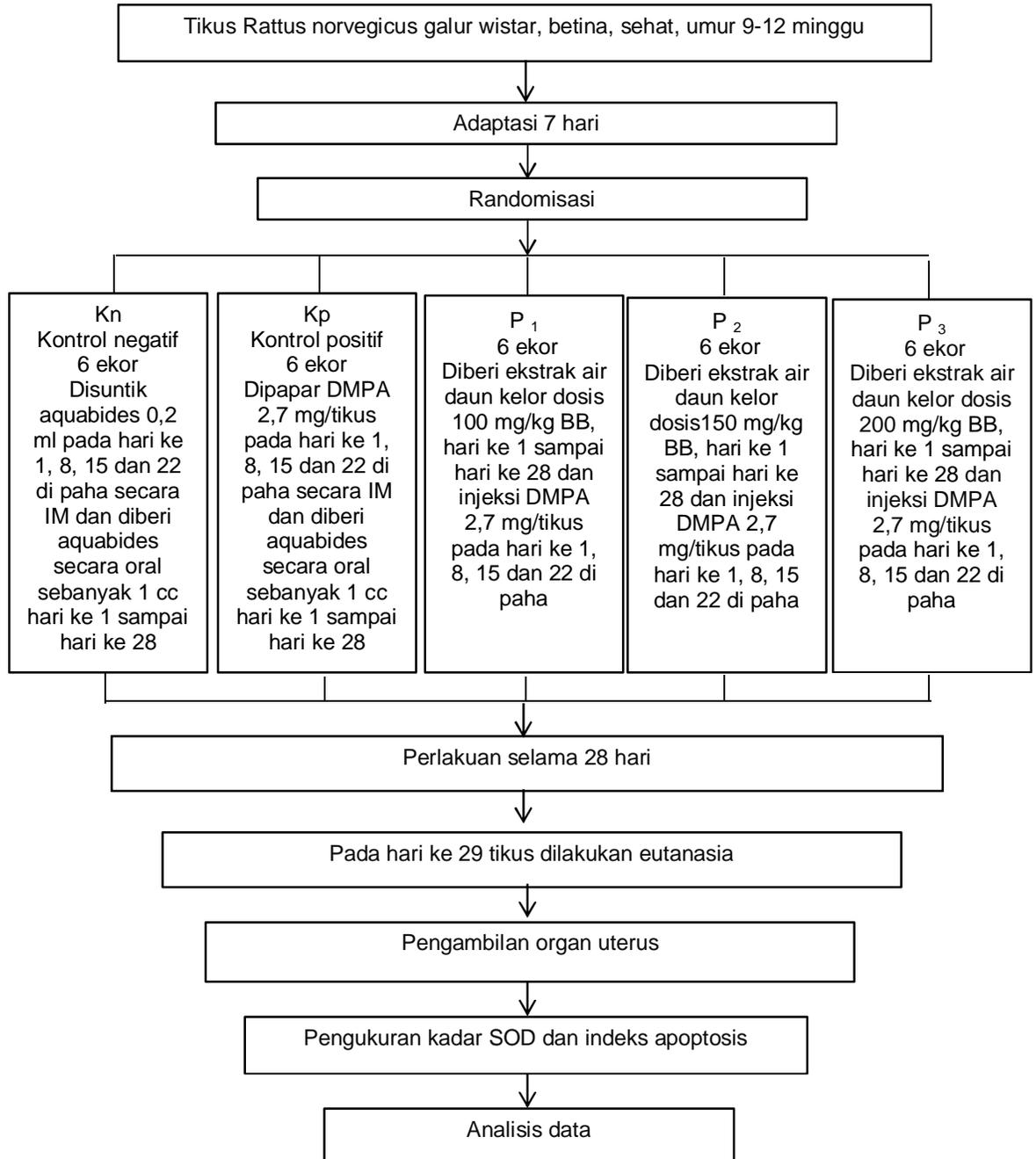
Kesimpulan diambil dengan kriteria sebagai berikut :

- 1) Korelasi bernilai positif (+) berarti terdapat hubungan positif, yang artinya penambahan dosis ekstrak air daun kelor akan diikuti dengan penambahan kadar SOD maupun indeks apoptosis.
- 2) Korelasi bernilai negatif (-) berarti terdapat hubungan negatif, yang artinya penambahan dosis ekstrak air daun kelor akan diikuti dengan penurunan kadar SOD maupun indeks apoptosis .

Adapun kekuatan hubungan antara variabel digunakan kriteria sebagai berikut :

Adapun kekuatan hubungan antara variabel digunakan kriteria koefisien korelasi dan nilai korelasi 0 menunjukkan tidak ada korelasi, $0 < 0,2$ = korelasi sangat lemah, $0,2 < 0,4$ = korelasi lemah, $0,4 < 0,6$ = korelasi sedang, $0,6 < 0,8$ = Korelasi kuat, $0,8 - 1$ = korelasi sangat kuat (Dahlan, 2015).

4.14 Bagan Alur Penelitian



Gambar 4.2 Bagan Alur Penelitian

Keterangan :

P_{1,2,3} : Kelompok perlakuan

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Pembuatan dan Analisis Fitokimia Ekstrak Air Daun Kelor

5.1.1 Pembuatan Ekstrak Air Daun Kelor

Hasil sediaan ekstrak air daun kelor setelah dilakukan freeze dryer adalah 85 gram yang berasal dari 170 gram simplisia daun kelor direndam pada 1,7 liter air 70⁰ C selama 1 jam kemudian disaring. Kemudian dilakukan freeze dryer dan diperoleh hasil sediaan sebanyak 85 gram dan disimpan dalam suhu 4⁰C untuk mempertahankan kandungannya.

5.1.2 Analisis Fitokimia secara Kualitatif dan Kuantitatif

Berdasarkan penelitian pendahuluan ekstrak air daun kelor memiliki kandungan saponin, tanin, flavonoid dan alkaloid. Selanjutnya diketahui bahwa hasil uji total polifenol yang dianalisis dengan metode spektrofotometri : Kode A (simplisia daun kelor yang direndam air 40⁰C), kode B (simplisia daun kelor yang direndam air 70⁰C) dan kode C (simplisia daun kelor yang direndam air 100⁰C) menunjukkan bahwa simplisia daun kelor yang direndam air 70⁰C menunjukkan total polifenol tertinggi sebesar 1,38 ± 0,00 %. Hasil total polifenol dapat dilihat pada Lampiran 5.

5.2 Hasil Pengukuran Kadar SOD dan Indeks Apoptosis

Tabel 5.1. Kadar SOD dan Indeks Apoptosis

Kelompok Sampel	Replikasi	Kadar SOD	Indeks Apoptosis (%)
K-	1	2,12	31,11
	2	3,44	35,36
	3	2,29	32,05
	4	1,88	44,17
	5	2,02	32,06
K+	1	2,80	45,53
	2	2,49	53,34
	3	2,23	45,87
	4	2,17	44,89
	5	2,07	41,19
P1	1	2,72	26,21
	2	2,17	22,43
	3	2,12	34,17
	4	1,80	48,45
	5	3,20	31,05
P2	1	1,88	43,14
	2	2,12	37,84
	3	1,76	43,69
	4	2,42	39,36
	5	1,68	37,79
P3	1	3,32	23,33
	2	3,32	26,72
	3	2,99	26,04
	4	1,97	37,84
	5	1,62	38,83

Keterangan : K- adalah kontrol negatif dengan injeksi aquabides 0,2 ml dan aquabides secara oral, K+ adalah kontrol positif yang diinjeksi DMPA 2,7 mg/tikus dan aquabides secara oral, P1 adalah perlakuan 1 yaitu diinjeksi DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis I, P2 adalah perlakuan 2 yang diinjeksi DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis II dan P3 adalah perlakuan 3 dengan diinjeksi DMPA dan ekstrak air daun kelor dosis III.

5.2.1 Kadar SOD

Uji asumsi normalitas pada variabel kadar SOD menunjukkan $p = 0,684$ atau $p > 0,05$ menunjukkan asumsi normalitas variabel kadar SOD telah terpenuhi. Pengujian asumsi homogenitas ragam pada kadar SOD didapatkan $p = 0,060$ ($p > 0,05$) oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada kadar SOD telah terpenuhi.

Hasil pengujian pengaruh pemberian ekstrak air daun kelor dengan beberapa level dosis terhadap kadar SOD dapat dilihat dalam tabel dibawah ini:

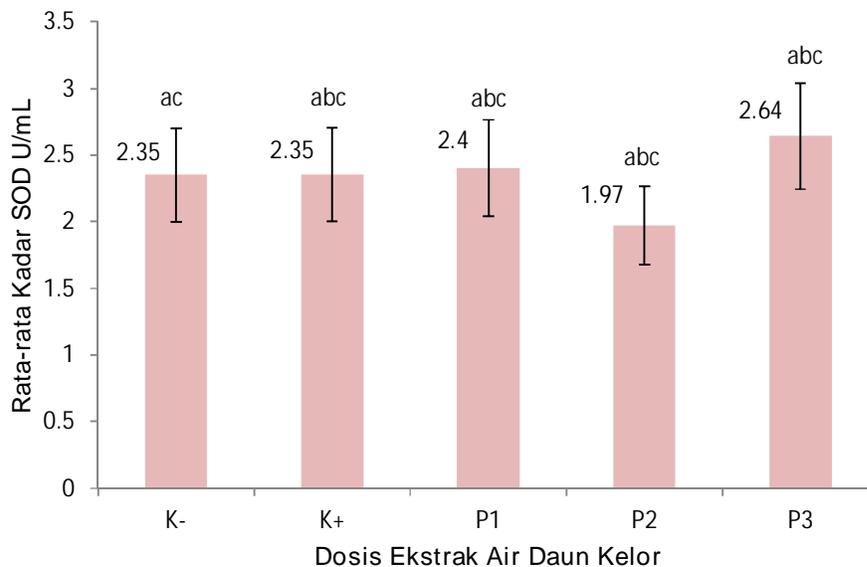
Tabel 5.2. Kadar SOD pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
K-	2.35 \pm 0.63 ^{ac}	0.456
K+	2.35 \pm 0.3 ^{abc}	
P1	2.4 \pm 0.56 ^{abc}	
P2	1.97 \pm 0.3 ^{abc}	
P3	2.64 \pm 0.8 ^{abc}	

Keterangan : Pada hasil analisis uji Anova One Way didapatkan p-value sebesar 0.456 ($p > 0,05$) artinya tidak terdapat pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak air daun kelor terhadap kadar SOD dan jika memuat huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji Anova One Way, didapatkan p sebesar 0.456, artinya tidak ada perbedaan signifikan kadar SOD setelah diberikan ekstrak air daun kelor dalam berbagai dosis.

Rata-rata kadar SOD kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



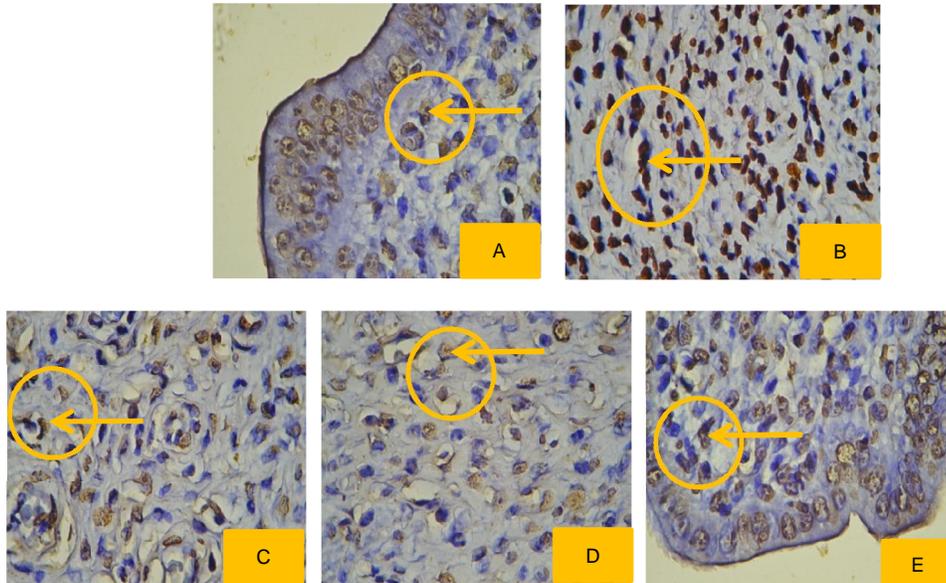
Gambar 5.1. Histogram Rata-Rata Kadar SOD pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor
Rata-rata kadar SOD meningkat pada kelompok perlakuan ekstrak air daun kelor dengan dosis 100 mg/kgBB (P1) dan dosis 200 mg/kgBB (P3).

Pada Gambar 5.1 ditunjukkan histogram rata-rata kadar SOD semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok Kontrol bahwa rata – rata kadar SOD kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif namun secara statistik kadar SOD tidak berbeda secara signifikan. Selanjutnya terlihat bahwa rata-rata kadar SOD lebih tinggi pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak air daun kelor dengan dosis 100 mg/kgBB (P1) dan dosis 200 mg/kgBB (P3) dan lebih rendah pada dosis 150 mg/kgBB (P2).

Pada uji Anova menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kadar SOD pada pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor maka tidak perlu dilanjutkan proses pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson Product Moment.

5.2.2 Indeks Apoptosis

Asumsi normalitas variabel indeks apoptosis didapatkan p-value lebih dari = 0,05 ($p > 0,05$) dimana $p = 0,129$ sehingga asumsi normalitas terpenuhi. Pada asumsi homogenitas indeks apoptosis juga sudah terpenuhi $p > 0,05$ yaitu $p = 0,186$.



Gambar 5.2 Gambaran Immunohistokimia Sel yang Apoptosis pada Endometrium (pembesaran 1000x)
Warna coklat menunjukkan sel yang apoptosis (ditunjuk dengan tanda panah) sedangkan warna ungu menunjukkan sel yang tidak apoptosis. Tampak perbedaan rerata indeks apoptosis pada gambar A, B, C, D dan E. Pada kelompok B (dipapar DMPA) menunjukkan banyak sel yang apoptosis sedangkan pada kelompok C, D dan E (paparan ekstrak air daun kelor) menunjukkan penurunan apoptosis.

Tabel 5.3. Indeks Apoptosis pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor

Perlakuan	Rerata \pm SD	p-value
K-	34.95 \pm 5.4 ^{ab}	0.007
K+	46.16 \pm 4.42 ^c	
P1	32.46 \pm 10.01 ^{ab}	
P2	40.36 \pm 2.86 ^{bc}	
P3	30.55 \pm 7.23 ^a	

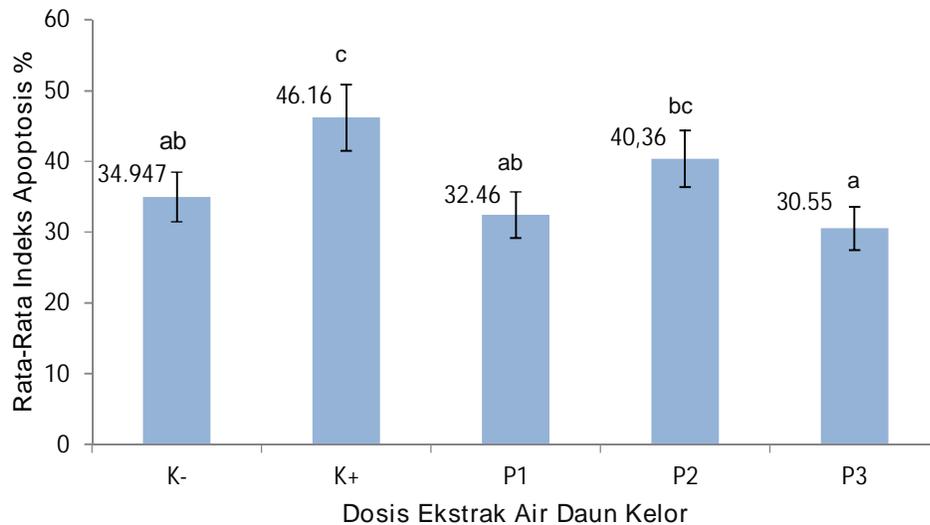
Keterangan: Pada rata-rata \pm sd apabila terdapat notasi huruf berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan apabila memuat huruf yang sama artinya tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji Anova One Way, didapatkan p-value sebesar 0.007 atau $p < 0,05$ artinya terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor terhadap indeks apoptosis.

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5.5 di atas, ditunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki rata-rata indeks apoptosis yang paling tinggi. Penurunan indeks apoptosis secara signifikan ditunjukkan oleh pemberian ekstrak air daun kelor dosis 100 mg/kgBB (P1) dan 200 mg/kgBB (P3). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok dosis tersebut memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif (K+). Sedangkan, jika dibandingkan dengan kelompok pemberian ekstrak air daun kelor dosis 150 mg/kgBB (P2), ditunjukkan rerata indeks apoptosis yang tidak berbeda signifikan dengan K+. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata \pm sd kelompok dosis tersebut memuat huruf yang sama dengan kelompok kontrol positif (K+). Pemberian ekstrak air daun kelor dosis 150 mg/kgBB (P2) belum mampu menurunkan indeks apoptosis secara signifikan.

Jika dibandingkan dengan kelompok K-, ditunjukkan bahwa tikus yang diberikan ekstrak air daun kelor dengan semua dosis, baik dosis 100 mg/kgBB (P1), 150 mg/kgBB (P2), maupun 200 mg/kgBB (P3) memiliki rata-rata indeks apoptosis yang tidak berbeda signifikan artinya pemberian berbagai dosis ekstrak tersebut mampu menurunkan indeks apoptosis hingga mendekati tikus yang normal.

Rata-rata indeks apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Gambar 5.3. Histogram Rata-Rata Indeks Apoptosis

Penurunan indeks apoptosis secara signifikan ditunjukkan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak air daun kelor dosis 100 mg/kgBB (P1) dan 200 mg/kgBB (P3).

Pada Gambar 5.2 ditunjukkan histogram rata-rata indeks apoptosis semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K-, terlihat bahwa rata-rata indeks apoptosis meningkat pada kelompok K+ dan memiliki notasi huruf yang berbeda dengan K- yang menunjukkan adanya peningkatan indeks apoptosis secara signifikan pada kelompok K+. Kemudian, pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 terjadi penurunan indeks apoptosis. Penurunan indeks apoptosis signifikan secara statistik ditunjukkan pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak air daun kelor dengan dosis 100 mg/kgBB (P1) dan 200 mg/kgBB (P3).

Untuk mengetahui hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks Apoptosis, dapat dilakukan proses pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson Product Moment. Berikut hasil pengujian hubungan antara dosis pemberian ekstrak daun kelor dengan indeks apoptosis dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5.4. Indeks Apoptosis pada Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor

Hubungan	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks Apoptosis	-0.550	0.012	Signifikan

Keterangan : Hasil pengujian hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis menunjukkan p-value <0.05 artinya pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor memiliki hubungan signifikan dengan indeks apoptosis.

Pada hasil pengujian hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis, didapatkan p-value sebesar 0.012 ($p < 0,05$) artinya pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis mempunyai hubungan yang signifikan. Koefisien korelasi bernilai -0.550 memiliki pengertian bahwa ada hubungan relatif cukup kuat antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis. Koefisien korelasi bernilai negatif menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak daun kelor yang diberikan, akan diikuti penurunan apoptosis.

5.2.3 Korelasi Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis

Untuk mengetahui hubungan antara kadar SOD dengan indeks apoptosis, dapat dilakukan proses pengujian dengan menggunakan uji Korelasi Pearson Product Moment. Berikut hasil pengujian hubungan antara kadar SOD dengan indeks apoptosis dengan menggunakan bantuan software SPSS :

Tabel 5.5 Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis

Hubungan	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis	-0.466	0.019	Signifikan

Keterangan : Hasil pengujian hubungan antara kadar SOD dengan indeks apoptosis menunjukkan p-value <0.05 artinya kadar SOD memiliki hubungan signifikan dengan indeks apoptosis.

Pada hasil pengujian hubungan antara kadar SOD dengan indeks apoptosis, didapatkan p-value sebesar 0.019 ($p < 0,05$) artinya kadar SOD dengan indeks apoptosis mempunyai hubungan yang signifikan. Koefisien korelasi bernilai -0.466 memiliki pengertian bahwa ada hubungan sedang antara kadar SOD dengan indeks apoptosis. Koefisien korelasi bernilai negatif menunjukkan bahwa peningkatan kadar SOD yang diberikan, akan diikuti penurunan apoptosis.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Kelor terhadap Kadar SOD Uterus Tikus Wistar.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa secara deskriptif rata – rata kadar SOD kelompok kontrol positif (diberikan DMPA) menurun dibandingkan kelompok kontrol negatif namun secara statistik kadar SOD tidak berbeda secara signifikan.

Hal ini disebabkan karena penggunaan DMPA dapat menekan pelepasan GnRH sehingga menekan sekresi LH preovulatorik dan menekan ovulasi, karena ovulasi dihambat, kadar progesteron dalam serum tetap rendah (<0,4 ng/ml) selama beberapa bulan setelah penyuntikan. Disamping itu DMPA juga menekan LH melewati sirkulasi. Estradiol rata-rata 50 pg/ml pada fase mid folikuler dini setelah penyuntikan DMPA, kadar estradiol serum mulai meningkat 4 bulan setelah 1 kali penyuntikan DMPA, ketika kadar DMPA turun < 0,5 ng/ml. Namun pada wanita yang telah menggunakan DMPA selama beberapa tahun, kadar serum estradiol bisa mencapai level terendah hingga 10 pg/ml (Cunningham et al., 2005; Hartanto, 2003; Prawirohardjo, 2003; Varney et al., 2006; Mishell, 2006).

FDA (Food Drug Administration) menyatakan bahwa perlu perhatian khusus bagi pemakaian jangka panjang DMPA (> 24 bulan) apabila kontrasepsi yang lain tidak cocok atau tidak adekuat bagi akses KB (FDA, 2004). Pada penelitian ini lama pemaparan DMPA pada tikus apabila dikonversi dengan waktu pada manusia adalah 1 tahun sehingga radikal bebas yang disebabkan oleh DMPA masih dapat dikompensasi oleh uterus sehingga kadar SOD di uterus kontrol positif tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif.

Penggunaan kontrasepsi progestin dapat menghambat kemampuan 17 - estradiol (E2) (Irwin, et al., 2011). Estradiol merupakan salah satu golongan estrogen yang dapat meningkatkan mekanisme perlindungan antioksidan, perokidasi lipid, menginduksi proliferasi uterus (Irwin, et al., 2011). Pada penelitian Razali (2008) menunjukkan bahwa pengguna KB DMPA selama 1-2 tahun didapatkan rata-rata kadar estradiol darah $78,69 \pm 29,76$ pg/ml dan pengguna KB DMPA selama 3-5 tahun adalah $54,23 \pm 21,07$ pg/ml dimana secara statistik tidak dijumpai hubungan bermakna. Kadar estradiol ini berkisar dalam fase folikuler. Tidak ada hubungan bermakna kadar estradiol pada pengguna KB DMPA 1-2 tahun dan pengguna KB DMPA 3-5 tahun mungkin menyebabkan kadar SOD uterus yang dipapar DMPA pada penelitian ini tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif, karena kadar SOD dipengaruhi oleh hormon estrogen. Ketika hormon estrogen menurun dan ikatan dengan reseptor estrogen rendah maka akan menurunkan aktivasi jalur sinyal intraseluler MAPK sehingga terjadi penurunan aktivasi NFkB dan aktivasi transkripsi gen SOD menurun (Vina et al., 2005).

Estrogen bekerja melalui reseptor estrogen. Estrogen memiliki 2 reseptor yaitu ER dan ER . Pada semua tipe sel endometrium dapat ditemui reseptor estrogen. Perubahan-perubahan yang terjadi pada sel endometrium pada tiap siklus menstruasi, mencerminkan perubahan-perubahan siklik pada estradiol yang menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor estrogen dan progesteron yang menyebabkan penurunan ekspresi reseptor estrogen (Firtz dan Speroff, 2005). Perubahan konsentrasi estrogen mewujudkan efek struktural dan fungsional dalam tuba falopi, rahim dan organ sasaran lainnya. Intensitas reseptor estrogen lebih banyak pada glandula epitel endometrium dari pada tuba falopi (Amso, 1994; Hegazy, 2015) Di tuba falopi dan uterus, ER ditemukan dalam inti sel epitel dari stroma dan sel otot dan ER tidak terdeteksi pada tuba falopi dan

uterus sedangkan pada ovarium, terdeteksi ER dan ER . Pada mencit yang kekurangan ER menunjukkan perkembangan uterus dan saluran telur yang normal, namun kesuburan berkurang dan kehamilan serta persalinan masih berlangsung normal. ER adalah reseptor yang sangat penting yang memediasi efek estrogen ke uterus yang ditunjukkan pada tikus yang kekurangan ER menunjukkan atrofi pada ovarium dan uterus (Pelletier, 2000). Tidak terdapat reseptor ER pada uterus mungkin menyebabkan kadar SOD uterus yang dipapar DMPA pada penelitian ini tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif karena kadar SOD dipengaruhi oleh hormon estrogen dan estrogen bekerja melalui reseptor estrogen.

Pemberian DMPA dapat menurunkan pertahanan antioksidan seperti MnSOD dan menyebabkan hipoestrogen. Hipoestrogen yang disebabkan karena penggunaan DMPA juga dapat meningkatkan kerentanan terhadap perubahan oksidatif yang dipicu oleh H₂O₂ dan mengakibatkan peroksida lipid. Disamping itu DMPA juga dapat menghambat sistem antioksidan yang diberikan oleh hormon ovarium sehingga dapat memperburuk kerentanan terhadap stres oksidatif (Irwin, et al., 2011). Estrogen sering dihubungkan mempunyai efek antioksidan karena mampu meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD. Estrogen dalam konsentrasi fisiologis ditemukan menjadi antioksidan yang kuat untuk mencegah terbentuknya radikal bebas (Borras et al., 2006). Rendahnya estrogen dapat menyebabkan penurunan aktivitas SOD yang mengakibatkan peningkatan akumulasi O₂^{•-}. Radikal bebas yang terakumulasi dapat menghambat SOD dan menurunkan enzim GPx dan CAT. Penurunan enzim – enzim tersebut dapat menyebabkan peningkatan hidrogen peroksida yang mengakibatkan terjadinya inaktivasi SOD (Mushusami, 2005). Menurut penelitian Veri et al., (2015) bahwa kadar SOD ovarium menurun signifikan pada ovarium tikus yang dipapar DMPA selama 28 hari.

SOD merupakan enzim antioksidan yang bertanggung jawab untuk mengkonversi O_2^- menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2). SOD dapat melindungi sel dari kerusakan atau kematian yang disebabkan efek berbahaya dari radikal bebas (Hu et al., 2005). SOD dikelompokkan menjadi tiga yaitu Cu/ ZnSOD (SOD1) yang berada pada sitoplasma, MnSOD (SOD2) yang ditemukan di mitokondria, dan ecSOD (SOD3) pada ekstraseluler yang semuanya membutuhkan Cu dan Mn untuk aktivasi. Bukti terbaru bahwa di setiap lokasi subseluler terdapat SOD (SODs). SODs juga memainkan peran yang penting dalam mencegah disfungsi endotel dan mitokondria. Semua kelompok SOD walaupun terdapat pada lokasi yang berbeda namun mengkatalisis reaksi yang sama yaitu mengkatalisis O_2^- menjadi H_2O_2 . SOD merupakan antioksidan endogen yang efektif dalam melindungi dari stres oksidatif (Fukai, 2011; Ghubory, 2012).

SOD1 memiliki karakteristik 32 kDa, homodimer, kofaktor metal (Cu^{2+} / katalitik) lokasi di sitosol dan jumlah lebih kecil adalah pada inter membran space (IMS) pada mitokondria. SOD1 juga dilaporkan pada nukleus, lisosom, peroksisom dengan menggunakan metode immunohistokimia. SOD1 memiliki distribusi yang luas pada semua sel. Pada gen manusia SOD1 terletak pada region 21q22.1 pada kromosom 21. SOD2 memiliki karakteristik 96 kDa, homotetramer, kofaktor metal adalah Mn^{3+} katalitik, terletak di matrik mitokondria. SOD3 memiliki karakteristik 135 kDa, homotetrameric secretory glycoprotein, lokasi di matrik ekstraseluler, permukaan sel dan jumlah yang lebih kecil terdapat pada plasma dan cairan ekstraseluler. SOD3 biasanya terdapat pada jaringan pembuluh darah, paru-paru, ginjal, rahim dan hati. SOD3 dalam jaringan diperkirakan sekitar 90%-99% dari SOD3 dalam tubuh. SOD3 terutama disintesis oleh vaskular sel otot polos dan fibroblast dan disekresikan ke matrik ekstraseluler dan permukaan sel endotel dengan mengikat heparin sulfat

proteoglikan (HSPGs), kolagen dan fibulin (Fukai dan Ushio Fukai, 2011). Pada semua jaringan terdapat SOD. Setiap organ tikus memiliki aktivitas SOD yang berbeda, pada hati terdapat aktivitas SOD yang paling tinggi selanjutnya diikuti aktivitas SOD pada kelenjar adrenal, ginjal, limpa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium, timus dan lemak (Aridiani dan Winahyu, 2007).

Kadar SOD dilakukan pengukuran dengan kolorimetri dengan membandingkan optical density sampel dengan kurva standar. Hasil yang didapatkan pada kadar SOD dinyatakan dalam U/mL. Kolorimetri adalah metode perbandingan menggunakan perbedaan warna. Metode kolorimetri mengukur warna suatu zat sebagai perbandingan. Biasanya cahaya putih digunakan sebagai sumber cahaya untuk membandingkan absorpsi cahaya relatif terhadap suatu zat. Salah satu faktor utama dari metode kolorimetri adalah intensitas warna yang harus proporsional dengan konsentrasinya (J. Bassett et al., 1991).

Selanjutnya rerata kadar SOD meningkat pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak Daun kelor dengan dosis 100 mg/kgBB (P1) dan dosis 200 mg/kgBB (P3). Sedangkan pada dosis 150 mg/kgBB (P2) justru terjadi penurunan kadar SOD.

Kelor memiliki fungsi antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas karena kandungan polifenol seperti flavonoid dan fenol. Polifenol pada daun kelor memiliki kemampuan antioksidan yang tinggi dan alami yang utama yang melindungi agen dari efek stres oksidatif, melindungi dari kerusakan oksidatif pada DNA, menangkap radikal bebas serta menghambat peroksida lipid/kerusakan lemak yang dapat menyebabkan apoptosis (Sestili et al., 1998; Lako et al., 2007; Kanatt, 2007; Moyo et al., 2012). Polifenol merupakan antioksidan yang mempunyai kapasitas dan sifat antioksidan yang sangat kuat yang mampu melindungi dari stres oksidatif dan penyakit degeneratif dan memberi perlindungan secara tidak langsung dengan mengaktifkan sistem pertahanan

endogen dan memodulasi proses sinyal seluler (Han et al., 2007) Fenol memiliki aktivitas antioksidan dengan memberikan elektron yang baik, mengakhiri reaksi berantai radikal dengan mengkonversi radikal bebas menjadi produk yang stabil serta menyerap untuk menetralsir radikal bebas dan mengurai dan menghambat peroksida lipid karena fenol memiliki sifat reduksi dan konjugasi struktur ring dan karboksil (Siddhuraju dan Becker, 2003; Adedapo et al., 2008; Oyedemi, Bradley dan Afolayan, 2010). Kandungan fenol, terutama yang paling banyak adalah kandungan glikosida yang banyak larut dalam air dan ethanol (Bravo, 1988). Flavonoid bersama-sama dengan antioksidan vitamin dan enzim dapat menjadi antioksidan yang melindungi tubuh dari kerusakan sel dan penyakit akibat stress oksidatif (Winarsi, 2014). Hal ini didukung pada penelitian lama menunjukkan dosis 100 dan 200 dapat meningkatkan kadar SOD secara signifikan (Lamau et al., 2016). Namun pada dosis 150 mg/kg BB ekstrak air daun kelor tidak berdampak pada penurunan kadar SOD hal ini mungkin dipengaruhi beberapa faktor yaitu dosis paparan ekstrak air daun kelor yang diberikan yang tidak sesuai dan jumlah sampel yang kurang besar.

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka hipotesis pada penelitian ini tidak terbukti, artinya tidak ada perbedaan pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan kadar SOD pada uterus Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

6.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Ekstrak Air Daun Kelor terhadap Indeks Apoptosis Endometrium Tikus Wistar.

Dari hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemaparan DMPA akan meningkatkan indeks apoptosis pada endometrium secara signifikan. Pada kelompok kontrol positif (DMPA) memiliki rata-rata indeks apoptosis meningkat dan memiliki notasi huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol negatif yang menunjukkan adanya peningkatan indeks apoptosis secara signifikan pada kelompok Kontrol positif.

DMPA memiliki mekanisme menekan pelepasan GnRH sehingga kadar LH juga menurun. Selain itu DMPA juga akan menekan lonjakan LH melalui sirkulasi. Apabila suntikan DMPA dimulai dalam lima hari sejak awal menstruasi, maka efek kontrasepsi akan muncul dengan cepat karena ovulasi tidak akan terjadi pada bulan pertama, namun apabila suntikan mulai diberikan lebih dari lima hari setelah menstruasi, maka klien harus menggunakan metode kontrasepsi penunjang selama beberapa minggu karena kemungkinan ovulasi tidak dapat dicegah pada bulan pertama tersebut (Cunningham, 2005; Hartanto, 2003; Prawirohardjo, 2003; Varney et al., 2006; Mishell, 2006; Lizarelli et al., 2009; Thurman dan Soper, 2006). Karena ovulasi ini ditandai oleh lonjakan sekresi LH dihipofisis dan kunci dari terjadinya ovulasi adalah efek peningkatan estrogen dan efek umpan balik positif estrogen pada sekresi LH pada pertengahan siklus (Heffner dan Schust, 2008).

Pengukuran indeks apoptosis adalah dengan immunohistokimia tunnel karena indeks apoptosis melihat pada sel yang mengalami apoptosis dan pada immunohistokimia tunnel assay ada prosedur pemberian kromagen DAB yang memberikan warna coklat pada inti sel yang mengalami fragmentasi DNA (Roche, 2004). Apoptosis adalah mekanisme genetik yang terprogram yang

memungkinkan sel untuk bunuh diri sehingga terjadi kematian sel. Proses kematian sel sangat penting untuk kelangsungan hidup organisme banyak sel dengan menyingkirkan sel yang rusak atau terinfeksi yang dapat mengganggu fungsi normal, perkembangan dan mencegah dari transformasi onkologi (Portt et al., 2011). Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang diatur secara genetik dan digambarkan dengan membran blebbing (pengerumbungan membran sel), penyusutan sel, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA (Renehan et al., 2001).

Penggunaan DMPA dapat menyebabkan penurunan produksi estradiol pada ovarium (Bronstein et al., 2012). Hipoestrogen secara tidak langsung dapat meningkatkan radikal bebas dan akumulasi radikal bebas dapat menginduksi stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan dan apoptosis sel (Hu et al., 2005; Bae et al., 2006; Silva et al., 2010). Stres oksidatif yang disebabkan karena peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan kromosom tidak stabil dan apoptosis sel (Asadi et al., 2012). Disamping itu stres oksidatif yang disebabkan DMPA juga menyebabkan peningkatan kerusakan DNA (7-8-dihydro-8-oxoguanine/8-oxoG) (Krikun et al., 2010).

DMPA dapat secara langsung menyebabkan apoptosis pada endometrium, dimana penggunaan DMPA dalam jangka waktu yang panjang akan menyebabkan peningkatan radikal bebas dan peningkatan radikal bebas akan menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif menginduksi apoptosis jalur intrinsik, hal ini menyebabkan gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembran mitokondria kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD, kemudian CARD bergabung membentuk apoptosom. Apoptosom kemudian mengikat pro-caspase 9 dan mengaktifasi menjadi caspase 9 (caspase inisiator). Caspase 9 akan mengaktifasi procaspase-3 menjadi caspase 3. Caspase 3 teraktivasi yang menyebabkan degradasi

kromosom DNA, aktivasi protease, degradasi nukleus dan protein-protein sitoskeletal, kondensasi kromatin dan sitoplasmik, fragmentasi nukleus selanjutnya terbentuklah apoptotic body. Selanjutnya sel apoptotic body memberi signal "eat me" sehingga terjadi tahap fagositosis dan fagosit bisa dilakukan oleh makrofag atau sel tetangga dari sel yang mengalami apoptosis (Portt et al., 2011; CCRV Farmasi UGM).

Pada Tabel 5.2 menunjukkan rata-rata kadar SOD P2 lebih rendah dari P1 dan P3 yaitu 1,97 U/ml dan pada tabel 5.3 menunjukkan rata-rata indeks apoptosis P2 lebih tinggi dari P1 dan P2 sebesar 40,36%.

Hal ini sesuai dengan teori bahwa apoptosis juga dapat terjadi apabila terjadi penurunan tingkat SOD dan akumulasi radikal bebas (Hu et al., 2005; Silva et al., 2010). Penggunaan kontrasepsi progestin dapat merugikan pertahanan antioksidan dengan menurunkan aktivitas/ ekspresi MnSOD (Irwin et al., 2011). SOD merupakan enzim antioksidan yang dapat menghambat apoptosis dan bekerja dengan mengkatalisis O_2^- menjadi H_2O_2 (Hu et al., 2005; Silva et al., 2010). H_2O_2 yang toksik akan diuraikan menjadi O_2 menjadi H_2O oleh katalase. GPx mengkatalisis reduksi hidroperoksida oleh glutathione (Lamau et al., 2016). Apabila H_2O_2 bereaksi dengan $Fe^{2+}/ e^-/ H^+$ maka akan menjadi radikal bebas (Muchtadi, 2013). Radikal reaktif hidroksil yang bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda akan membentuk radikal lipid. Radikal lipid yang bereaksi dengan molekul oksigen akan berubah menjadi radikal lipid peroksil. Apabila radikal lipid tidak direduksi oleh antioksidan, maka akan terjadi proses peroksida lipid (Winarsi, 2007).

DMPA dapat menginduksi apoptosis pada sel endotel endometrium manusia (Choksuchat et al., 2009; Lizarelli et al., 2009). Penggunaan kontrasepsi progestin dalam jangka waktu yang lama menyebabkan peningkatan radikal bebas yang memicu stres oksidatif (Krikun et al., 2002). Radikal bebas yang

berlebihan akan merangsang kerusakan oksidatif pada biomolekul yang penting seperti DNA, lipoprotein, dan lipid sehingga menyebabkan apoptosis sel (Yasdanparast dan Ardestani).

Selanjutnya menurut Jain et al., (2006) bahwa pada hari ke 14 stroma endometrium mengalami peningkatan apoptosis secara bermakna setelah dipapar DMPA, dan pada kelenjar tidak terjadi peningkatan apoptosis secara bermakna. Pada penelitian ini untuk pengamatan apoptosis adalah pada stoma, kelenjar, pembuluh darah serta epitel endometrium.

Penggunaan DMPA untuk hormon terapi pada wanita akan memicu terjadinya apoptosis, menurunkan usia hidup pada sel neuron, meningkatkan apoptosis hingga 40 % pada sel saraf otak (Nilsen et al., 2009). Sangat sedikit/tidak ada jaringan endometrium pada hasil biopsi akseptor lama DMPA (Hartanto, 2004). Disamping itu DMPA juga dapat mempengaruhi histologi endometrium setelah suntikan pertama dan kedua pada akseptor yang menggunakan DMPA yaitu digambarkan dengan histologi endometrium yang atrofi, penurunan kepadatan microvaskuler, penipisan epitel endometrium, penipisan dan fragilitas kelenjar dan dinding pembuluh darah sehingga menimbulkan gangguan perdarahan, gangguan perdarahan yang abnormal inilah yang menyebabkan banyak akseptor KB menghentikan pemakaian kontrasepsi progestin jangka panjang (Krikun et al., 2002; Simbar, 2007; Choksuchat et al., 2009; Lizarelli et al., 2009). Hal ini juga sesuai dengan penelitian dari Veri et al., (2015) bahwa DMPA yang dipapar selama 28 hari pada tikus secara signifikan meningkatkan apoptosis pada jaringan endometrium dan ovarium.

Pada Tabel 5.3 dapat dilihat bahwa p-value sebesar 0.007 atau $p < 0,05$ artinya terdapat pengaruh yang signifikan pemberian berbagai dosis ekstrakair daun kelor terhadap indeks apoptosis. Dan berdasar pada hasil uji LSD 5 % menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun kelor dosis 100 mg/kg BB (P1)

dan dosis 200 mg/kg BB (P2) dapat menurunkan indeks apoptosis pada tikus yang dipapar DMPA secara signifikan, sedangkan pada P3 menunjukkan bahwa tidak mempengaruhi indeks apoptosis secara signifikan.

Berdasarkan hasil uji korelasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.4 didapatkan p-value sebesar 0.012 yang menunjukkan bahwa pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis mempunyai hubungan yang signifikan. Koefisien korelasi bernilai -0.550 memiliki pengertian bahwa ada hubungan relatif cukup kuat antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis. Koefisien korelasi bernilai negatif menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak daun kelor yang diberikan, akan diikuti penurunan apoptosis

Pada beberapa penelitian menunjukkan efek antioksidan dari kelor ditimbulkan oleh beberapa komponen senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Berdasarkan penelitian Lamau et al., 2016 menunjukkan bahwa ekstrak air daun kelor mempunyai sifat antioksidan dengan meningkatkan aktivitas kadar SOD, CAT, GPx pada semua kelompok perlakuan. Ekstrak air daun kelor memiliki aktivitas dalam menangkal radikal bebas dan aktivitas antioksidan yang diuji dengan uji DPPH (Sidduraju dan Becker, 2003; Khalafalla et al., 2010). Disamping dapat menangkal radikal bebas ekstrak air daun kelor juga mampu mencegah dari kerusakan biomolekuler dan perlindungan dari kerusakan oksidatif (Sreelatha dan Padma, 2009). Kelor memiliki kandungan polifenol dan antioksidan kuat tertinggi, vitamin, mineral, asam amino esensial lengkap dan kandungan senyawa lainnya (Krisnadi, 2015). Kandungan vitamin, mineral dan asam amino esensial tersebut sangat berguna dalam regenerasi sel (Tilong, 2012; Farooq et al., 2012). Polifenol dapat menghambat peroksida lemak dan apoptosis hati, menangkap radikal bebas, menurunkan jumlah radikal bebas dan memutus rantai pembentukan peroksida lipid pada tahap inisiasi dan

propagasi serta sebagai antiapoptosis melalui kadar caspase-3 yang bertahan pada kondisi normal sehingga sel terlindungi dari kematian maupun apoptosis akibat stres oksidatif (El-Beshbishy, et al., 2011).

Kandungan daun kelor yang juga memiliki peran penting sebagai antioksidan adalah flavonoid. Komponen bioaktif fenol utama daun kelor yang termasuk golongan flavonoid adalah quercetin yang mempunyai kemampuan mengikat atom atau sebagai penangkal radikal bebas sehingga tidak terbentuk ROS yang berlebihan (Adewole et al., 2006). Disamping itu juga flavonoid mempunyai peran dalam menghentikan reaksi berantai radikal bebas (Bamishaiye et al., 2011; Lakshminarayana et al., 2011).

Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka hipotesis terbukti yaitu ada perbedaan pengaruh dan hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) terhadap indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

6.3 Korelasi Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis

Dari hasil penelitian juga diketahui bahwa secara statistik hubungan antara kadar SOD dengan indeks apoptosis, didapatkan p-value sebesar 0.019 ($p < 0,05$) artinya kadar SOD dengan indeks apoptosis mempunyai hubungan yang signifikan dengan koefisien korelasi bernilai -0.466 memiliki pengertian bahwa ada hubungan sedang antara kadar SOD dengan indeks apoptosis. Koefisien korelasi bernilai negatif menunjukkan bahwa peningkatan kadar SOD yang diberikan, akan diikuti penurunan apoptosis.

Hal ini sesuai dengan teori bahwa DMPA melalui sirkulasi menekan GnRH sehingga sekresi LH preovularik dan menekan ovulasi. Setelah penyuntikan DMPA kadar estradiol rata-rata 50 pg/ml namun pada pengguna DMPA yang telah menggunakan DMPA beberapa tahun kadar estradiol bisa

mencapai level terendah hingga 10 pg/ml (Cunningham et al., 2005; Hartanto, 2003; Prawirohardjo, 2003; Varney et al., 2006; Mishell, 2006).

Pemberian DMPA dapat menyebabkan hipoestrogen. Hipoestrogen yang disebabkan karena penggunaan DMPA juga dapat meningkatkan kerentanan terhadap perubahan oksidatif yang dipicu oleh H_2O_2 dan mengakibatkan peroksida lipid (Irwin et al., 2011). Estrogen memiliki efek antioksidan dan mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD dan GPx (Borras et al., 2006). Estradiol tidak berperan sebagai antioksidan kimia, namun lebih berperan dalam meningkatkan ekspresi gen enzim antioksidan SOD dan GPx di dalam mitokondria. Pada studi in vitro menggunakan jaringan kelenjar payudara menunjukkan kerja estradiol melalui interaksi dengan reseptor estrogen dengan alur transduksi sinyal meliputi ikatan estrogen dengan reseptor estrogen, fosforilasi MAPK, aktivasi NFkB dan akhirnya terjadi upregulasi gen antioksidan (Vina et al., 2005). Rendahnya estrogen menyebabkan penurunan aktivitas enzim SOD yang mengakibatkan peningkatan akumulasi O_2^- . Akumulasi radikal bebas tersebut tidak hanya menghambat SOD tetapi juga menyebabkan penurunan enzim GPx dan CAT (Muthusami, 2005).

SOD mengkonversi O_2^- menjadi H_2O_2 , selanjutnya H_2O_2 dirubah menjadi O_2 dan H_2O oleh katalase. GPx merubah H_2O_2 menggunakan glutation dan menghasilkan GSSH, kemudian dirubah kembali menjadi GSH oleh enzim glutathione reductase dengan dibantu NADPH (Hanukoglu, 2006). H_2O_2 merupakan oksidan non radikal dan apabila H_2O_2 bereaksi dengan $Fe^{2+}/ e^-/ H^+$ maka akan berubah menjadi radikal bebas (radikal reaktif hidroksil/ reaksi fenton) (Muchtadi, 2013). Radikal reaktif hidroksil memisahkan elektron dari asam lemak tak jenuh ganda (RH) dan menimbulkan radikal lipid. Radikal lipid yang bereaksi dengan molekul oksigen maka berubah menjadi radikal lipid peroksil. Jika radikal

lipid peroksidasi tidak direduksi oleh antioksidan, maka akan terjadi peroksida lipid (Winars, 2007).

Apoptosis dapat terjadi karena adanya peningkatan peroksida lipid yang disebabkan karena stres oksidatif (Sharma et al., 2012). Radikal bebas dapat menginduksi modifikasi oksidatif makromolekuler seluler, menghambat fungsi protein dan meningkatkan apoptosis (Circu dan Tak, 2010). DMPA dapat menginduksi apoptosis pada sel endotel endometrium manusia (Choksuchat et al., 2009; Lizarelli et al., 2009). Penggunaan DMPA dalam jangka waktu yang panjang juga dapat memicu peningkatan apoptosis pada ovarium (Tasdemir et al., 2009). Disamping itu penggunaan DMPA dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan berbagai macam permasalahan kesehatan bahkan penyakit degeneratif (Bronshtein et al., 2012).

Penelitian dapat diaplikasikan dimasyarakat untuk memberikan penyuluhan kepada akseptor DMPA tentang manfaat ekstrak air daun kelor untuk mengatasi keluhan misalnya gangguan menstruasi yang disebabkan DMPA dan menerapkan penggunaan ekstrak air daun kelor untuk mengatasi keluhan dan efek samping yang terjadi khususnya gangguan menstruasi pada akseptor KB DMPA, ekstrak air daun kelor dengan dosis 100 mg/kg BB tikus apabila dikonversi dengan dosis pada manusia adalah 5,6 gram/kg BB manusia per hari selama menggunakan DMPA. Pada akseptor KB DMPA yang sudah menggunakan lebih dari 24 bulan perlu adanya perhatian khusus apabila metode kontrasepsi yang lain tidak cocok, namun apabila ada kontrasepsi yang cocok perlu diberikan informasi untuk mengganti kontrasepsi DMPA dengan metode kontrasepsi yang lain apabila penggunaannya sudah lebih 2 tahun karena hal itu akan berpengaruh pada berbagai macam masalah kesehatan bahkan penyakit degeneratif.

Keterbatasan Penelitian adalah meneliti indeks apoptosis pada endometrium secara keseluruhan yaitu pada stroma, kelenjar, epitel dan pembuluh darah, hal ini berbeda dengan penelitian Jain et al., (2006) yang membedakan antara indeks apoptosis pada stroma dan indeks apoptosis pada kelenjar serta jumlah sampel yang kurang banyak, diharapkan penelitian dengan membedakan indeks apoptosis pada stroma dan indeks apoptosis pada kelenjar dan menambahkan jumlah sampel sehingga standar deviasi menjadi lebih kecil serta waktu paparan DMPA yang lebih lama untuk melihat kadar SOD dan indeks apoptosis.

BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka didapatkan kesimpulan bahwa tidak ada pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan kadar SOD uterus tikus wistar dan ada pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor dengan indeks apoptosis endometrium tikus wistar, dengan uraian sebagai berikut:

- 1) Tidak ada perbedaan pengaruh kadar SOD pada pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA. Namun secara deskriptif perlakuan dosis 100 dan 200 mg/kgBB/hari menunjukkan peningkatan kadar SOD.
- 2) Ada perbedaan indeks apoptosis pada pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dimana pada dosis 100 mg/kg BB/hari sudah menunjukkan penurunan indeks apoptosis.
- 3) Ada hubungan antara pemberian berbagai dosis ekstrak air daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk) dengan indeks apoptosis pada endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.
- 4) Ada hubungan antara kadar SOD dan indeks apoptosis endometrium Tikus Wistar yang dipapar DMPA.

7.2 Saran

Upaya preventif penanganan efek samping DMPA dengan konsumsi ekstrak air daun kelor belum dapat dipastikan dengan meningkatkan kadar SOD pada uterus, namun sudah dapat dipastikan dapat menurunkan indeks apoptosis jaringan endometrium sehingga meningkatkan kepadatan microvaskuler, ketebalan epitel endometrium, stroma kelenjar dan dinding pembuluh darah dan menurunkan gangguan perdarahan pada akseptor KB DMPA.

Petugas kesehatan yang memberikan pelayanan kontrasepsi DMPA perlu memberikan perhatian khusus kepada pengguna DMPA yang menggunakan KB lebih dari 24 bulan apabila kontrasepsi yang lain tidak cocok atau tidak adekuat bagi akseptor KB. Namun bila ada kontrasepsi yang lain yang cocok dan adekuat maka pengguna DMPA perlu diberikan konseling agar mengganti dengan kontrasepsi yang lain karena apabila DMPA digunakan dalam waktu yang panjang akan mengakibatkan berbagai masalah kesehatan bahkan penyakit degeneratif.

Selanjutnya perlu dilakukan penelitian dengan membedakan indeks apoptosis pada stroma, kelenjar, pembuluh darah dan epitel, jumlah sampel yang diperbanyak, meneliti kadar SOD dalam waktu paparan DMPA lebih dari 2 tahun, meneliti kadar SOD dalam darah, meneliti kadar serum progesteron dan reseptor progesteron dan , kadar serum estradiol, reseptor estrogen dan , meneliti kadar LDL dan HDL.

DAFTAR PUSTAKA

- Adedapo, A.A., Jimoh, F. O., Afolayan, A. J., dan Masika, P. J., 2008. Antibacterial and antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of *Calpurnia aurea*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(53): 1472-6882.
- Adewole, S.O., Caxton, Martins, E.A., Ojewole, J.A., 2006. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 4(1): 64–74.
- Al-Gubory, K..J., Garrel, C., Faure, P., dan Sugino, N., 2012. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species induced oxidative stress. *Reproductive BioMedicine Online*, 25: 551-560.
- Amso, N.N., Crow, J., dan Shaw, R., 1994. Comparative immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors in the Fallopian tube and uterus during different stages of the menstrual cycle and the menopause. *Hum. Reprod*, 9: 1027-1037.
- Andrea, R.T., Soper, E.D, 2005. Endometrial Histology of Depomedroxyprogesterone Acetate Users: A Pilot Study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2006: 1-6.
- Ariani, Winahyu, S., 2007 Aktivitas superoksida dismutase dan patologi. [http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/13962/BabII.Tinjau an Pustaka Ariadini, Sekar Winahyu_G2007.pdf](http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/13962/BabII.Tinjau%20an%20Pustaka%20Ariadini,%20Sekar%20Winahyu_G2007.pdf). Di akses 12 Februari 2017 jam 21: 51.
- Asadi I, Jahanshahi M dan Golalipour JM., 2012. Effect of Vitamin E on Oocytes Apoptosis in Nicotine Treated Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15: 880-884.
- Bae JH, Sang HL, Hee JK, dan Jin YL., 2006. The Role of *Salicornia herbacea* in Ovariectomy-Induced Oxidative Stres. *Pharmaceutical Society of Japan*, 29: 1305-1309.
- Bakry, S., Aseem, N., Montaser, N., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of DMPA on female rats, *Toxicology Letters*, 196S: S37–S351.
- Bamishaiye, E.I.F.F., Olayemi, E.F., Awagu, Bamshaiye, O.M., 2011, Proximate and phytochemical composition of *moringa oleifera* leaves at three stages of maturation. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3: 233-237.

- Bigrigg, A., Evans, M., Gbolade, B., Newton, J., Pollard, L., Szarewski, A., Thomas, C., Walling, M., 1999. Depo provera. position paper on clinical use, effectiveness and side effects. *Br J Fam Plann*, 25(2): 69-76.
- Borras C., Gambini, J., Gomez-Cabrera, M.C., Sastre, J., Pallardo, P.V., Mann, G.E., Vina, J, 2006. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NfkappaB. *FASEB J*, 20: 2136–2138.
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V dan Viña, J, 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802: 205–211.
- Brahm, U., 2007. Ragam metode kontrasepsi, EGC, Jakarta.
- Bravo, L., 1988. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev*, 56: 317-333.
- Bronshtein, A., Krol, A., Schlesinger, H., and Altstein, M. 2012. Development of immunochemical methods for purification and detection of steroid drug medroxyprogesterone acetat. *Journal of Environmental Protection*. 3: 624-639.
- Burkit, H, B. Young & Heath, JW 1999, *Wheaters functional hystology, A text and colour atlas*, third ed edn, Churchill livingstone, Edinburg.
- Cameron, S., 2013. Subcutaneous depo-medroxyprogesterone acetate. *Journal of Family Planning and Reproductive Health Care*, 39: 75-77.
- CCRV Farmasi UGM, Mekanisme dan regulasi apoptosis. ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/mekanisme-dan-regulasi-apoptosis1.pdf. Diakses pada tanggal 28 Februari 2017.
- Cheeseman, K.H. dan Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 49(3): 481-493.
- Choksuchat, C., Zhao, S., Deutch, T.D., Kimble T.D., Archer D.F., 2009. Effects of progesterone, levonorgestrel and medroxyprogesterone acetate on apoptosis in human endometrial endothelial cells. *Contraception*, 79(2): 139–145.
- Circu, M.L., dan Talk, Y.A., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(6): 749-762.
- Company, Cayman, Chemical, 2014. Superoxide dismutase assay kit item No.706002, Cayman Chemical Company. U.S.A. Diakses 22 Februari 2017.
- Dahlan MS., 2015. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan deskriptif, bivariat dan multivariat dilengkapi dengan menggunakan SPSS. Jakarta : Epidemiologi Indonesia.

- El-Beshbishy, H.A., Tork, O.M., El-Bab, M.F., and Autifi, M.A., 2011. Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine induced liver injury in rats, *Journal Pathophysiology*. 18: 125-135.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol*. 35(4): 495-516.
- Estina. 2011, 'Jenis dan ciri-ciri tikus laboratorium disertai gambar. <http://dokterternak.wordpress.com/2010/11/05/jenis-dan-ciri-ciri-tikus-laboratorium-disertai-gambar>. Diakses 12 Februari 2017.
- Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., Khan, A.R., Farooq, S. 2012. Medicinal properties of moringa oleifera: an overview of promising healer. *J Med Plants Res*, 6(27): 4368–74.
- FDA talk paper. 2003, Available at ; black box warning added concerning long-term use of depo provera contraceptive injection. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/20246scs019_Depo-provera_lbl.pdf. Diakses 14 Juni 2017.
- Fritz, M.A., dan Speroff, L., 2005. *Clinical gynecology endocrinology & infertility*, Lippincott Williams & Wilkins, USA, p. 849-969.
- Fukai, T., dan Ushio-Fukai, M., , 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases, *Antioxidants & Redox Signaling*. 15(6): 1583-1606.
- Ghasi, S., Nwobodo, E., Ofili, J.O., 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of moringa oleifera Lam in high-fat diet fed wistar rats. *Ethnopharmacol*, 69: 21–25.
- Hamid, A.A., Aiyelaagde, O.O., Usman, L.A., Ameen, O.M., dan Lawal, A, 2010. Antioxidants : its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8): 142-151.
- Han, X., Shen, T and Lau, H. 2007. Review : Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 8: 950-988.
- Hanafiah, K.A., 2012. Rancangan percobaan teori dan aplikasi. Edisi tiga, Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Handa S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D, 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, ICS-UNIDO, Italian.
- Hanukoglu, I., 2006. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metabolism Reviews*, 38: 71–196.
- Hartanto H., 2003. Keluarga berencana dan kontrasepsi, Pustaka Sinar Harapan, Jakarta, p.163-178.

- Hartanto, H. 2004. *Macam-macam metode KB*. Jakarta: EGC.
- Heffner L., J., Schust, Danny, J, 2008. *At a glance sistem reproduksi*, Erlangga, Jakarta, p.38-40.
- Hegazy, R., Hegazy, Abdelmonem, 2015. DMPA- Induced changes in estrogen and progesterone receptors of ampulla of rat-oviducts: an immunohistochemical study. *Universal Journal of Medical Science*, 3(2): 33-44.
- Hu, Y., Rosen, D.G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., and Huang, P., 2005. Mitochondrial manganese superoxide dismutase expression in ovarian cancer : role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J.Biol.Chem*, 280: 39485-39492.
- Iannaccone, P.M., dan Jacob, H. J, 2009. *Rats!. disease models & mechanisms*, 2: 206-210.
- Irwin, R.W., Yao, J., Ahmed, S.S., Hamilton, R.T., Cadenas, E., and Brinton, R.D., 2011. Medroxyprogesterone acetate antagonizes estrogen up-regulation of brain mitochondrial function. *Endocrinology*. 152: 556-567.
- J. Bassett, R.C. Denney, G.H. Jeffery, dan J. Mendham., 1991. *Buku Ajar Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik terjemahan dari Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis*, penerjemah: A. Hadyana P. dan Ir. L. Setiono. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Jain, J Jakimiuk, A.J., Bode, F.R., Ross, D., Kaunitz, A.M., 2004. Contraceptive efficacy and safety of DMPA-SC. *Contraception*, 70: 269-275.
- Jain, J. K., Li, A., Yang, W., Minoo, P., and Felix, J. C., 2006. Effect of mifepristone on proliferation and apoptosis of human endometrium in new users of medroxyprogesterone acetate. *Journal Human Reproduction*, 21(3): 789-809.
- Jain, K.J., Li, A., Yang, W., Minoo, P. dan Felix, J.C, 2006. Effects of mifepristone on proliferation and apoptosis of human endometrium in new users of medroxyprogesterone acetate. *Human Reproduction*, 21(3): 798–809.
- Jeppsson, S., Johansson, E.D.B., Ljungberg, O., Sjoberg, N.O., 1997. Endometrial histology and circulating levels of medroxyprogesterone acetate (MPA), estradiol, FSH and LH in women with MPA induced amenorrhoea compared with women with secondary amenorrhoea. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 56(1):43–48.
- Jurow, R., Shaupe, Donna, 2006. *Current clinical practice : the handbook of contraception: A Guide for Practical Management*, Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 101-115.
- Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., Schmidt, H., 2006. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187: 1–17.

- Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A., 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem*, 100: 451–458.
- Karim, M., Yassin, S., Ammar, R., El Mahgoub, S., El Ganzoury, B., Fikri, F. 1971. Effects of injectable contraceptive progestogens on the puerperal uterus. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 9(6):221–231.
- Kementerian Kesehatan RI, 2015. Profil kesehatan indonesia 2014. <http://www.kemkes.go.id>. Diakses pada Jumat, 28 oktober 2016 jam 14.00 WIB.
- Khalafalla, M.M., Abdellatef, E., Dafalla, H. M., Nassrallah, A. A., Aboul-Enein, K. M., Lightfoot, D. A., El-Deeb, F. A., El-Shemy, H. A., 2010. Active principle from moringa oleifera lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 9: 8467–8471.
- Kokawa, K., Shikone, T., Otani, T., Nishiyama, R., Ishii, Y., Yagi, S., Yamoto, M., 2001. Apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in Patients with endometrioid, clear cell and serous carcinomas of the uterine endometrium. *Gynecologic Oncology*, 81: 178-183.
- Krikun, G., Critchley, H., Schatz, F., Wan, L., Caze, R., Baergen R.N., and Lockwood, C.J., 2002. Abnormal uterine bleeding during progestin-only contraception may result from free radical-induced alterations in angiotensin expression. *American Journal of Pathology*. 161(3): 979-986.
- Krisnadi A., 2015. Kelor supernutrisi, Edisi Revisi Maret 2015, Kolorina.Com, Kunduran Blora, p. 15-17.
- Lako, J., Trenerry, V.C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier, R., 2007. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem*, 101: 1727–1741.
- Lakshminarayana, M., Shivkumar, H., Rimaben, P., Bhargava, V.K., 2011, Antidiarrhoeal activity of leaf extract of moringa oleifera in experimentally induced diarrhoea in rats, *International Journal of Phytomedicine* 3 : 68-74
- Lamou, B., Taiwe, G. S., Hamadou, A., Abene, Houlay, J., Atour, M. M., dan Tan, P. V., 2016. Antioxidant and antifatigue properties of the aqueous extract of moringa oleifera in rats subjected to forced swimming endurance test. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1-9.
- Liu, Y. P.C., Suresh, V., 2007. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chem*, 101: 1533–1539.
- Lizarelli, P.M., Martins, W.P., Vieira, C.S., Soares, G.M., Franceschini, S.A., Ferriani, R.A., and Patta, M.C., 2009. Both a combined oral contraceptive and depot medroxyprogesterone acetate impair endothelial function in young women. *Contraception*, 79: 35–40.

- Marcondes, F.K., Bianchi, F. J. dan Tanno, A. P., 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 64(4A): 609-614.
- Medforth. J., Battersby, S., Evans, M., Marsh, B., dan Walker, A., , 2013. *Kebidanan oxford dari bidan untuk bidan*, EGC, Jakarta.
- Mishell, D.R. Jr., El-Habashy, M.A., Good, R.G., Moyer, D.L. 1968. Contraception with an injectable progestin: a study of its use in postpartum women. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 101(8):1046–1053.
- Mishell, D.R., 1996. Pharmacokinetics of depot medroxyprogesterone acetate contraception. *J Reprod Med*, 41: 381-390.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P.J., Muchenje, V., 2012. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Science*, 91: 441–447.
- Musarofah, 2015. *Tumbuhan antioksidan*, P.T. Remaja Rosdakarya, Bandung, p. 1-21.
- Muthusami, S., Ramachandran, I., Muthusamy, B., Vasudevan, G., Prabhu, V., Subramaniam, V., Jagadeesan, A., Narasimhan, S, 2005. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats, *Clinica Chimica Acta*. 360: 81–86.
- Nelson, A.L., 2010. DMPA : battered and bruised but still needed and used in the USA. *Expert Rev. Obstet. Gynecol*, 5(6): 673-686.
- Nilsen, J., Morales, A., and Brinton, R.D., 2006. Medroxyprogesterone acetate exacerbates glutamate excitotoxicity. *Gynecological Endocrinology*, 22(7): 355-361.
- Nugrahaningsih. Y., Ari, 2014. Identifikasi apoptosis dengan metode tunel pasca pemberian ekstrak sambiloto dan engaruhnya terhadap volume tumor, *Sainteknl*, 12(2): pp. 139-146.
- Osmanova, Süreyya., Sezer, Ebru., Turan, Volkan., Zeybek, Burak., Terek, Mustafa Cosan., Kanit, Lutfiye., 2011. The effects of raloxifene treatment on oxidative status in brain tissues and learning process of ovariectomized rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(4) :295-300.
- Oyedemi, S.O., Bradley, G., dan Afolayan, A. J., 2010. In-vitro and in-vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4: 70-78.
- Partodiharjo, 1992, *Ilmu reproduksi hewan*, Mutiara Sumber Widya, Jakarta.

- Pelletier, G., Labrie, C., dan Labrie, F., 2000. Localization of oestrogen receptor, oestrogen receptor and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*, 165: 359–370.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813: 238–259.
- Prawirohardjo, H., 2003. Buku panduan praktis pelayanan kontrasepsi, Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, Jakarta, p.MK-40.
- R. D. Cahyanti. H.K., W. Adiyono., 2009. Bcl-2 dan indeks apoptosis pada hiperplasia endometrium non atipik simpleks dan kompleks, *Indones J Obstet Gynecol*, 33-1: pp. 48-55.
- Razali, R.R. 2008, Kadar estradiol serum pada pemakaian DMPA 1 Tahun dan 3 Tahun. repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/6460/1/08E00815.pdf. Diakses 14 Juni 2017.
- Renehan, A.G., Booth, C., Potten, C. S, 2001. What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ*, 322: 1536-1538.
- Roche, 2004. In situ cell death detection kit, POD, Roche. <https://pim-eservices.roche.com/.../1e73f7a8-95ed-e311-98a1->. Diakses 22 Februari 2017.
- Samsudin dan Darmono, 2011. Farmakologi eksperimental, Universitas Indonesia, Jakarta, p. 7-11.
- Santoso, S., 2005. Mengolah data statistik secara profesional. Gramedia. Jakarta.
- Sereepapong, W., Chotnopparatpattara, P., Taneepanichskul, S., Markham, R., Russell, P. dan Fraser I. S, 2004. Endometrial progesterone and estrogen receptors and bleeding disturbances in depot medroxyprogesterone acetate users. *Human Reproduction*, 19(3): 547-552.
- Sestili, P., Guidarelli, A., Dacha, M., Cantoni, O., 1998. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radical Bio. Med*, 25: 196–200.
- Sharma, V., Singh, P., Pandey, A.K., dan Dharwan, A. 2012. Induction of oxidative stres, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zink oxide nanoparticles. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 745 (1-2): 84-91.
- Siddhuraju, P. dan Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2144–2155.

- Sihite., Adventus, Bov., Endang., Tinny., 2013. Ekstrak metanol daun kelor menurunkan ekspresi BCL-2, TRAIL-R1, dan kadar caspase-3 jaringan kolon tikus yang diinduksi DMBA. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(4): 201-206.
- Silva, F.M., Marques, A. dan Chaveiro, A., 2010. Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*, 4: 127-133.
- Simbar, M., Tehrani, F. R., Hashemi, Zeinab., Zham, Hananeh, Fraser, I. S, 2007. A comparative study of cyclofem and depot medroxyprogesteron acetate (DMPA) effect on endometrial vasculature. *J. Fam Plann Reprod Health Care*, 33(4): 271-276.
- Siregar T.M., Eveline, Aya, F. A, 2015. Kajian aktivitas dan stabilitas antioksidan ekstrak kasar bawang daun (*Allium fistulosum* L.), Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim Semarang. Diakses 7 maret 2017.
- Solimun. 2001. Kaidah dan Metode Analisis Data. Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang hal 55.
- Sowash J.R., 2009. Rat dissection. <https://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf>. Diakses 22 Februari 2017.
- Speroff, L. dan Darney, P.D, 2005. Pedoman klinis kontrasepsi, Edisi 2. Jakarta : EGC.
- Speroff, L., dan Fritz, M.A, 2011. *Clinical gynecology endocrinology & infertility* eight edition, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Speroff, L., dan Fritz, M.A., 2005. *Clinical gynecologyc endocrinology & infertility*, Lippincott & Wilkins, USA, p. 849-969.
- Sreelatha, S. dan Padma, P.R., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum Nutr*, 64: 303-311.
- Steel R., G.D., dan Torrie, J.H, 1995. Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biomedic (Terjemahan bambang sumantri). Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Susilawati, E., Barlianto, W., Wiyasa, arsana, W.I., 2015. Cholesterol/HDL-c ratio lowering effect of green tea in rats exposed to depot medroxiprogesterone acetate. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 5(3): 165-167.
- Tasdemir, N., Kilic, S., Lortlar, N., Yuksel, B., and Ozaksit, G. 2009. The long-term apoptotic effects of progesterone-only contraceptive on endometrium and ovary in rats. In *Fertility & Sterility* (p. 9). Turkey
- Tilong, A.D. 2012. Ternyata kelor penakluk diabetes, DIVA Press; Yogyakarta.
- Varney, H., Kriebs J.M., Gejor, C.L., 2006. Buku ajar asuhan kebidanan, Edisi 4, Volume 1, EGC, Jakarta, p.481-483.

- Veri N., Aulia, F., Ratnawati, R., Hidayati, D.Y.N., Noorhamdani., Dwijayasa, P.M, 2015. Protective effect of green tea against ovarian and endometrial apoptoses in rats treated with depot medroxyprogesterone acetate. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 7: 105-109.
- Verma, R.A., Vijayakumar, M., Mathela, C.S., Rao, C.V, 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of moringa oleifera leaves, *Food and Chemical Toxicology*. 47: 2196–2201.
- Verma, V.K., Singh, N., Saxena, P., and Singh, R. , 2012. Anti-ulcer and antioxidant activity of moringa oleifera (Lam) leaves against aspirin and ethanol induced gastric ulcer in rats. *Int. Res. J. of Pharmaceuticals*, 2(2): 46-57.
- Vina, J., Borras, C., Gambini, J., Sastre, J dan Pallardo, F.V., 2005. Why females live longer than males? importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett.*, 579: 2541–2545.
- WHO, 2011. Family planning a global handbook for providers update, WHO, p. 59-80.
- Winarsi, H., 2007. Antioksidan alami & radikal bebas: potensi dan aplikasinya dalam kesehatan, Kanisius, Yogyakarta, p. 11-105.
- Winarsi, H., 2014. Antioksidan daun kapulaga, Graha Ilmu, Yokyakarta, p. 1-47.
- Yazdanparast, R., dan Ardestani, A., 2007. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of cyperus rotundus. *Journal of Medicinal Food*, 10: 667–674.
- Zainuddin, M., 2011. Metodologi penelitian, Unair Press, Surabaya.

Lampiran 11

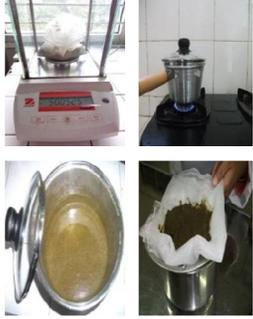
Hasil Penelitian Kadar SOD dan Indeks Apoptosis

Kelompok Sampel	Replikasi	Kadar SOD	Indeks Apoptosis (%)
Kn	1	2,12	31,11
	2	3,44	35,36
	3	2,29	32,05
	4	1,88	44,17
	5	2,02	32,06
Kp	1	2,80	45,53
	2	2,49	53,34
	3	2,23	45,87
	4	2,17	44,89
	5	2,07	41,19
P1	1	2,72	26,21
	2	2,17	22,43
	3	2,12	34,17
	4	1,80	48,45
	5	3,20	31,05
P2	1	1,88	43,14
	2	2,12	37,84
	3	1,76	43,69
	4	2,42	39,36
	5	1,68	37,79
P3	1	3,32	23,33
	2	3,32	26,72
	3	2,99	26,04
	4	1,97	37,84
	5	1,62	38,83

Lampiran 12

Dokumentasi Penelitian

Proses Ekstraksi Air Daun Kelor

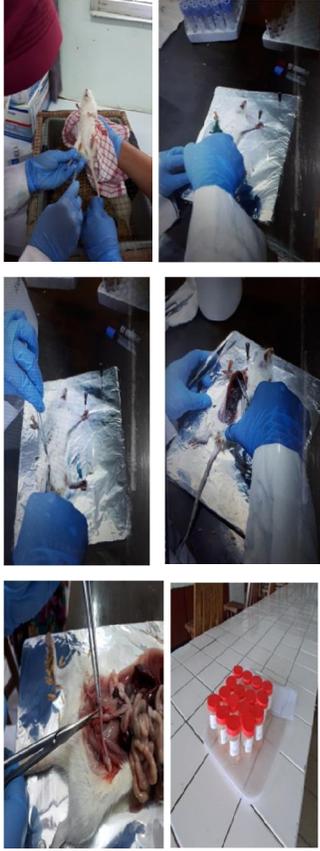
No	Uraian	Dokumentasi
1	Siapkan 170 gram simplisia daun kelor direndam pada 1,7 liter air 70 ⁰ C selama 1 jam kemudian disaring	
2	Lakukan freeze dryer pada ekstrak air daun kelor di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Brawijaya.	
3	Buat larutan stok 50 mg/ml dengan menimbang 5 gram ekstrak air daun kelor dilarutkan dalam 100 ml aquabides, selanjutnya membuat larutan dengan konsentrasi sesuai dengan kebutuhan	

Perlakuan

No	Uraian	Dokumentasi
1	Alat dan bahan yang digunakan a. Sonde b. Spuit 1 cc c. Depo-provera d. Ekstrak air daun kelor e. Alkohol spray	
2	Menyiapkan ekstrak air daun kelor	
3	Setelah masa aklimatisasi, tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3.	
4	Pemberian makan dan minum tikus dilakukan setiap hari	

5	Pengantian sekam dan pembersihan kandang	
6	<p>Pemberian ekstrak air daun kelor, aquabides, Injeksi DMPA berdasarkan kelompok yaitu</p> <p>a. Kontrol negatif : disuntik aquabides 0,2 ml pada hari ke 1, 8, 15 dan 22 di paha secara IM dan diberi aquabides secara oral sebanyak 1 cc hari ke 1 sampai hari ke 28.</p> <p>b. Kontrol positif : disuntik DMPA 2,7 mg/tikus pada hari ke 1, 8, 15 dan 22 di paha secara IM dan diberi aquabides secara oral sebanyak 1 cc hari ke 1 sampai hari ke 28.</p> <p>c. Perlakuan 1 : diberi ekstrak air daun kelor dosis 100 mg/kg BB, hari ke 1 sampai hari ke 28 dan injeksi DMPA 2,7 mg/tikus pada hari ke 1, 8, 15 dan 22 di paha.</p> <p>d. Perlakuan 2 : diberi ekstrak air daun kelor dosis 150 mg/kg BB, hari ke 1 sampai hari ke 28 dan injeksi DMPA 2,7 mg/tikus pada hari ke 1, 8, 15 dan 22 di paha</p> <p>e. Perlakuan 3 : diberi ekstrak air daun teh hijau dosis 200 mg/kg BB, hari ke 1 sampai hari ke 28 dan injeksi DMPA 2,7 mg/tikus pada hari ke 1, 8, 15 dan 22 di paha</p>	

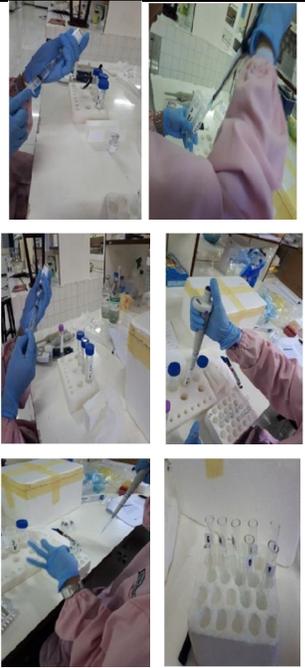
Pembedahan

No	Uraian	Dokumentasi
1	<p>Persiapan alat dan bahan yang digunakan saat pembedahan : pinset, gunting, sarung tangan, papan bedah, tempat untuk bangkai bedah, ketamin, formalin 10%.</p>	
2	<p>a. Tikus diinjeksi ketamin 80 mg/kg BB pada area peritoneal.</p> <p>b. Ditunggu sampai tikus benar-benar lemas dan tidak bergerak lagi.</p> <p>c. Tikus diletakkan diatas alas papan dengan perut menghadap ke atas (terfiksasi dengan baik). Tikus ditempatkan pada atas papan dengan menggunakan jarum pentul yang ditancapkan pada keempat telapak kaki.</p> <p>d. Membuka dinding perut dengan menggunakan gunting dan pinset secara hati-hati dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan kesamping kiri dan kanan pada sisi atas dan bawah dan diafragma dibuka. Setelah itu uterus dibuka dengan hati-hati dengan cara menggantung tepat pada bagian isthmus tuba fallopi kiri dan kanan dan pada bagian bawah (batas</p>	

	<p>antara servik dan uterus).</p> <p>e. Kemudian uterus dibersihkan dari seluruh ligamen yang melekat. Selanjutnya uterus dibersihkan dari darah menggunakan NaCl 0,9 % tiriskan organ menggunakan kertas saring dengan satu kali tekanan.</p> <p>f. Setelah air pada organ mulai mengering, uterus dipisahkan antara tandur uterus kanan dan kiri.</p> <p>g. Kemudian masukkan tandur uterus kanan kedalam PBS pH 7,4 kemudian ditimbang untuk selanjutnya menguji kadar SOD dan masukkan tandur uterus kiri dalam botol yang berisi fixative buffer formalin 10% dan direndam selama 12-24 jam untuk menguji indeks apoptosis.</p> <p>h. Bagian tandur uterus kanan siap untuk dilakukan uji kadar SOD dan bagian tandur uterus kiri diproses menjadi preparat di laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya yang selanjutnya untuk menguji indeks apoptosis.</p> <p>i. Bangkai tikus dikubur dengan kedalaman 0,5 meter.</p>	
--	--	--

Uji SOD (Colorimetry)

No	Uraian	Dokumentasi
1	<p>Persiapan Kit SOD, alat dan bahan : Superoxide Dismutase Assay Kit, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, sukrosa dan sentrifuse</p>	
2	<p>Meghomogenkan Jaringan</p> <p>a Jaringan dibilas dengan phosphate buffered saline (PBS) dengan pH 7.4) untuk menghilangkan sel darah merah, endapan atau gumpalan.</p> <p>b Homogenisasi dalam 5-10 ml/ gram jaringan pada buffer HEPES (dingin) konsentrasi 20 mM. pH 7,2 yang mengandung 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, dan 70 mM sukrosa.</p> <p>Berat organ uterus tiap kelompok dan buffer HEPES yang digunakan :</p> <p>A1 : 0,0488 x 5ml : 0,244 ml A2 : 0,0490 x 5 ml : 0,245 ml A3 : 0,0651 x 5 ml : 0,325 ml A4 : 0,1031 x 5 ml : 0,515 ml</p>	

	<p>A5 : 0,0653 x 5 ml : 0,326 ml B1 : 0,0974 x 5 ml : 0,487 ml B2 : 0,0949 x 5 ml : 0,474 ml B3 : 0,0986 x 5 ml : 0,493 ml B4 : 0,0649 x 5 ml : 0,324 ml B5 : 0,0991 x 5 ml : 0,495 ml C1 : 0,1541 x 5 ml : 0,770 ml C2 : 0,1122 x 5 ml : 0,561 ml C3 : 0,0983 x 5 ml : 0,491 ml C4 : 0,0953 x 5 ml : 0,476 ml C5 : 0,1038 x 5 ml : 0,519 ml</p> <p>c. Lalu disentrifus selama 5 menit dengan 1500xg atau 4000 rpm pada 4°C.</p> <p>d. Supernatan diambil untuk pengujian dan apabila supernatan tidak dilakukan pengujian segera maka disimpan dalam -80°C</p>	
3	Reagen Preparation	
	<p>a. Assay Buffer 8 ml assay buffer 10X ditambah 27 ml HPLC grade water menjadi 30 ml diluted assay buffer</p> <p>b. Sampel Buffer 2 ml sampel buffer 10X ditambah 18 ml HPLC grade water menjadi 20 ml diluted sampel buffer</p> <p>c. Radical Detector 50 µl stock ditambah 19,95 diluted assay buffer menjadi 20 ml diluted radical detector</p> <p>d. SOD Standart 20 µl SOD standart ditambah 1,98 ml sampel buffer menjadi 2 ml SOD stock solution</p> <p>e. Xantine Oxidase 50 µl stock ditambah 1,95 ml sampel buffer</p>	

	menjadi 2 ml diluted xantineoxidase	
4	SOD Assay	
	<p>a. Standart : 200 μl radical detector ditambah 10 μl standart.</p> <p>b. Sampel : 200 μl radical detector ditambah 10 μl sampel</p> <p>c. Tambahkan 20 μl xantine oxidase</p> <p>d. Shake 96 well plate yang telah ditutupi dengan cover plate sampai tercampur</p> <p>e. Inkubasi plate pada shaker selama 30 menit pada suhu ruang</p> <p>f. Baca absorbansi 440-460 nm dengan menggunakan plate reader</p>	

Pembuatan Preparat

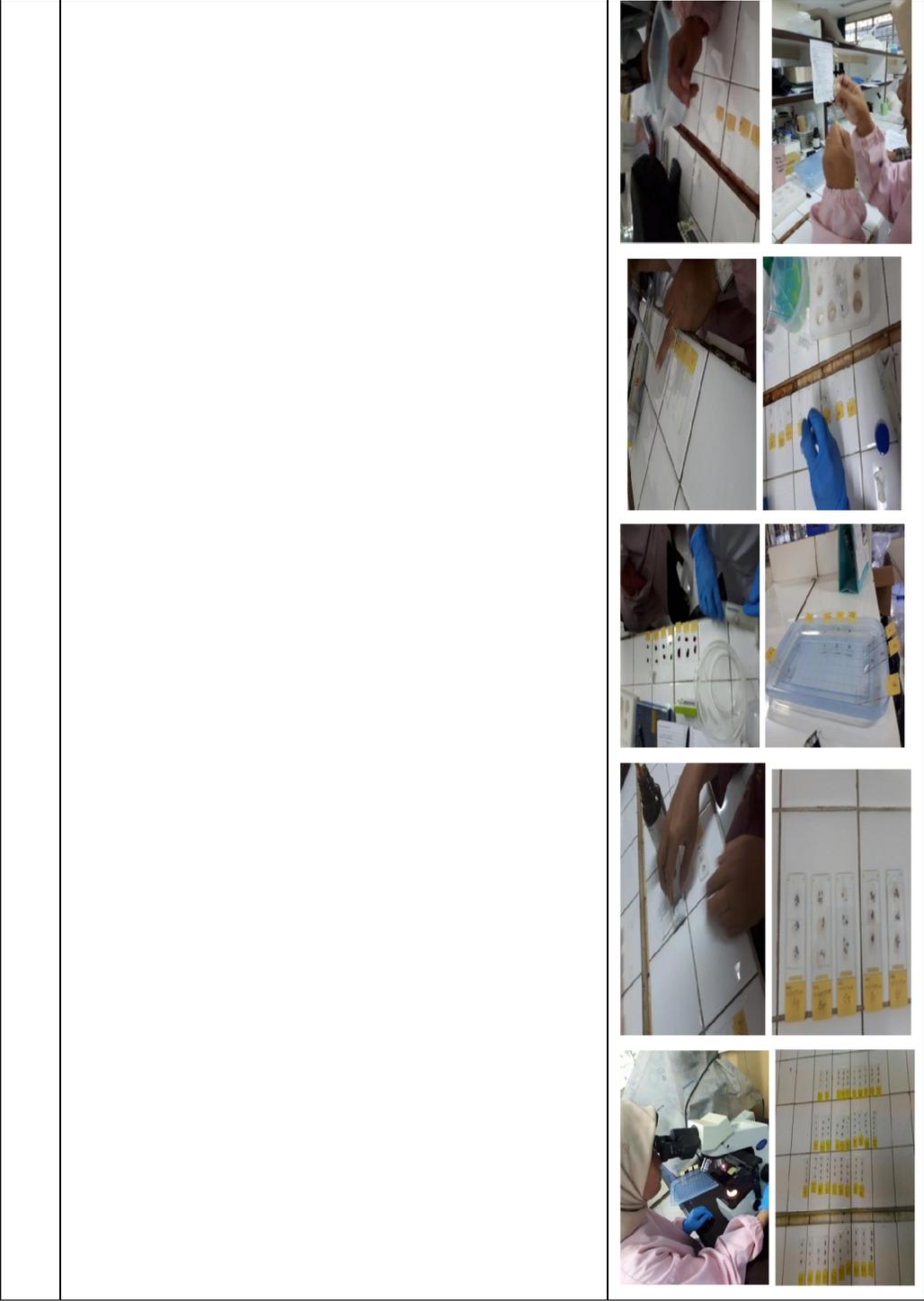
No	Uraian	Dokumentasi
1	<p>Bahan dan alat</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Organ uterus dalam tempatnya (formalin 10%) b. Kaset tempat organ jaringan c. Alas tempat pemotongan organ d. Pinset e. Sarung tangan f. Pensil g. Tissue tex prosesor h. Oven i. Mikrotom j. Slide poli-L-lysine 	
2	<ul style="list-style-type: none"> f. Organ diisolasi dengan larutan buffer formalin 10% (fiksasi) selama semalam untuk tujuan mengawetkan jaringan agar susunan jaringan menyerupai seperti kondisi sewaktu hidup g. Jaringan dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan di teliti h. Jaringan dipotong kurang lebih ketebalan 2-3 milimeter i. Dimasukan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti. j. Dimasukan ke larutan formalin 10% sebelum diproses/dimasukan ke alat Tissue Tex Prosesor 	
3	<ul style="list-style-type: none"> a. Jaringan terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir. b. Diproses menggunakan alat/mesin Tissue Tex Prosesor selama 90 menit c. Alarm bunyi tanda selesai d. Jaringan di angkat dari mesin Tissue Tex Prosesor 	

	<p>e. Jaringan di blok dengan paraffin sesuai kode jaringan.</p> <p>f. Jaringan diletakkan diatas es batu.</p>	
4	<p>a. Jaringan di potong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron</p> <p>b. Tahap pemotongan (sectioning), dimana blok paraffin yang mengandung jaringan endometrium yang sudah mengeras dipotong dengan ukuran ketebalan 4-5 μm dengan menggunakan pisau mikrotom.</p>	
5	<p>Hasil pemotongan diletakkan pada slide poli-L-lysine yang telah diberi label</p>	
6	<p>Defaraffin</p> <p>Diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70-80⁰C, kemudian di masukan ke dalam 2 tabung larutan syolol masing-masing 20 menit, setelah itu di masukan ke 4 tabung alkohol masing-masing tempat 3 menit (Hidrasi), dan yang terakhir dimasukan air mengalir selama 15 menit.</p>	

Uji Index Apoptosis (Immunohistokimia)

No	Uraian	Dokumentasi
1	<p>Persiapan kit apoptosis, alat dan bahan : slide, larutan xilol, ethanol absolut, ethanol 90 %, ethanol 80 %, ethanol 70% dan aquades steril, chamber, water bath, entellan, mikroskop.</p>	
2	<p>Deparafinasi</p> <p>a. Slide dipanaskan pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian direndam dalam larutan-larutan dibawah ini secara berurutan:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Xilol (2 x 10 menit) - Ethanol absolut (2 x 10 menit) - Ethanol 90 % (1 x 5 menit) - Ethanol 80 % (1 x 5 menit) - Ethanol 70% (1 x 5 menit) - Aquades steril (3 x 5 menit) 	
3	<p>Antigen Retrieval dengan Buffer Sitrat</p> <p>a. Rendam</p> <p>b. Keluarkan</p> <p>c. Cuci slide</p>	

		
4	<p>Immunohistokimia</p> <ol style="list-style-type: none"> Cuci PBS 3 X 5 menit Berikan Pro-K dalam Tris HCL PH 7,4 selama 25 menit dengan suhu 37⁰C Cuci PBS 3 x 5 menit Berikan Tunnel reaction mixture Inkubasi 60 menit dalam suhu 37⁰C dalam gelap. Cuci PBS 3 x 5 menit Berikan converter POD 50 µl selama 30 menit dalam suhu 37⁰C Cuci PBS 3 x 5 menit DAB substrat 3 menit Cuci aquabides Berikan mayer 2 menit Maunting 	



Lampiran 13

Uji Asumsi Normalitas Data

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for KadarSOD	,147	25	,173	,972	25	,684

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for IndeksApoptosis	,160	25	,099	,937	25	,129

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 14

Uji Asumsi Homogenitas Ragam

Levene's Test of Equality of Error
Variances^a

Dependent Variable: KadarSOD

F	df1	df2	Sig.
2,706	4	20	,060

Levene's Test of Equality of Error
Variances^a

Dependent Variable:

IndeksApoptosis

F	df1	df2	Sig.
1,714	4	20	,186

Lampiran 15

Uji Beda antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Kadar SOD

ANOVA

Kadar SOD

Perlakuan	Mean \pm SD	p-value
K-	2.35 \pm 0.63 ^{ac}	0.456
K+	2.35 \pm 0.3 ^{abc}	
P1	2.4 \pm 0.56 ^{abc}	
P2	1.97 \pm 0.3 ^{abc}	
P3	2.64 \pm 0.8 ^{abc}	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KadarSOD

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Differenc e (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	-,0031	,34818	,993	-,7294	,7232
	P1	-,0523	,34818	,882	-,7786	,6740
	P2	,3776	,34818	,291	-,3487	1,1039
	P3	-,2922	,34818	,411	-1,0185	,4341
Kp	Kn	,0031	,34818	,993	-,7232	,7294
	P1	-,0492	,34818	,889	-,7755	,6771
	P2	,3807	,34818	,287	-,3456	1,1070
	P3	-,2891	,34818	,416	-1,0154	,4372
P1	Kn	,0523	,34818	,882	-,6740	,7786
	Kp	,0492	,34818	,889	-,6771	,7755
	P2	,4299	,34818	,231	-,2964	1,1562
	P3	-,2399	,34818	,499	-,9662	,4864
P2	Kn	-,3776	,34818	,291	-1,1039	,3487
	Kp	-,3807	,34818	,287	-1,1070	,3456
	P1	-,4299	,34818	,231	-1,1562	,2964
	P3	-,6698	,34818	,069	-1,3961	,0565
P3	Kn	,2922	,34818	,411	-,4341	1,0185
	Kp	,2891	,34818	,416	-,4372	1,0154
	P1	,2399	,34818	,499	-,4864	,9662
	P2	,6698	,34818	,069	-,0565	1,3961

Lampiran 16

Uji Beda antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks
Apoptosis

ANOVA

Indeks Apoptosis

Perlakuan	Rerata \pm SD	p-value
K-	34.95 \pm 5.4 ^{ab}	0.007
K+	46.16 \pm 4.42 ^c	
P1	32.46 \pm 10.01 ^{ab}	
P2	40.36 \pm 2.86 ^{bc}	
P3	30.55 \pm 7.23 ^a	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IndeksApoptosis

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kn	Kp	-11,2160*	4,09145	,013	-19,7506	-2,6814
	P1	2,4880	4,09145	,550	-6,0466	11,0226
	P2	-5,4140	4,09145	,201	-13,9486	3,1206
Kp	P3	4,3980	4,09145	,295	-4,1366	12,9326
	Kn	11,2160*	4,09145	,013	2,6814	19,7506
	P1	13,7040*	4,09145	,003	5,1694	22,2386
P1	P2	5,8020	4,09145	,172	-2,7326	14,3366
	P3	15,6140*	4,09145	,001	7,0794	24,1486
	Kn	-2,4880	4,09145	,550	-11,0226	6,0466
P2	Kp	-13,7040*	4,09145	,003	-22,2386	-5,1694
	P2	-7,9020	4,09145	,068	-16,4366	,6326
	P3	1,9100	4,09145	,646	-6,6246	10,4446
P3	Kn	5,4140	4,09145	,201	-3,1206	13,9486
	Kp	-5,8020	4,09145	,172	-14,3366	2,7326
	P1	7,9020	4,09145	,068	-,6326	16,4366
	P3	9,8120*	4,09145	,026	1,2774	18,3466
	Kn	-4,3980	4,09145	,295	-12,9326	4,1366
	Kp	-15,6140*	4,09145	,001	-24,1486	-7,0794
	P1	-1,9100	4,09145	,646	-10,4446	6,6246
	P2	-9,8120*	4,09145	,026	-18,3466	-1,2774

Lampiran 17

Uji Korelasi antara Pemberian Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks Apoptosis

Indeks Apoptosis

Hubungan	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Ekstrak Air Daun Kelor dengan Indeks Apoptosis	-0.550	0.012	Signifikan

Lampiran 18

Uji Korelasi antara Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis

Hubungan	Koefisien Korelasi	p-value	Keterangan
Kadar SOD dengan Indeks Apoptosis	-0.466	0.019	Signifikan

BUKTI PUBLIKASI JURNAL

Dear Naili Rahmawati,

Your submission entitled **Moringa oleifera inhibits endometrial apoptosis of rattus injected DMPA** (Manuscript Number: JICE-2017-08-156) has been received by **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**.

You could follow status of your manuscript by login to your author account at www.ejmanager.com

Thank you for submitting your work to our journal.

Best regards,

Editor
Journal of Intercultural Ethnopharmacology
<http://www.jicep.com>

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Naili Rahmawati, lahir di Lamongan, 15 Mei 1985. Anak keempat dari lima bersaudara, putri dari Bapak Ach. Saleh dan Ibu Suniatin. Lulus MI Almuhtadi Lamongan Tahun 1998, MTS Almuhtadi Lamongan Tahun 2001, MAN Denanyar Jombang Tahun 2004. Tahun 2004 melanjutkan pendidikan Diploma III Kebidanan di STIKes



Nahdlatul Ulama Tuban. Tahun 2008 melanjutkan pendidikan Diploma IV Bidan Pendidik di Universitas Padjadjaran Bandung dan lulus Tahun 2010. Pada Tahun 2015 mengambil pendidikan Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tahun 2008 sampai Tahun 2010 penulis bekerja sebagai dosen di STIKes Nahdlatul Ulama Tuban selanjutnya pada Tahun 2011 sampai dengan sekarang penulis bekerja sebagai dosen di STIKes Dharma Husada Bandung.