

## 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 $\alpha$ -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 atrofi 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 hormonbinding globulin (SHBG), reseptor progesteron uterus, albumin dan alphasikoprotein. 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 lipofit 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 desidualis 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  $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  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  $13 \pm 1$  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

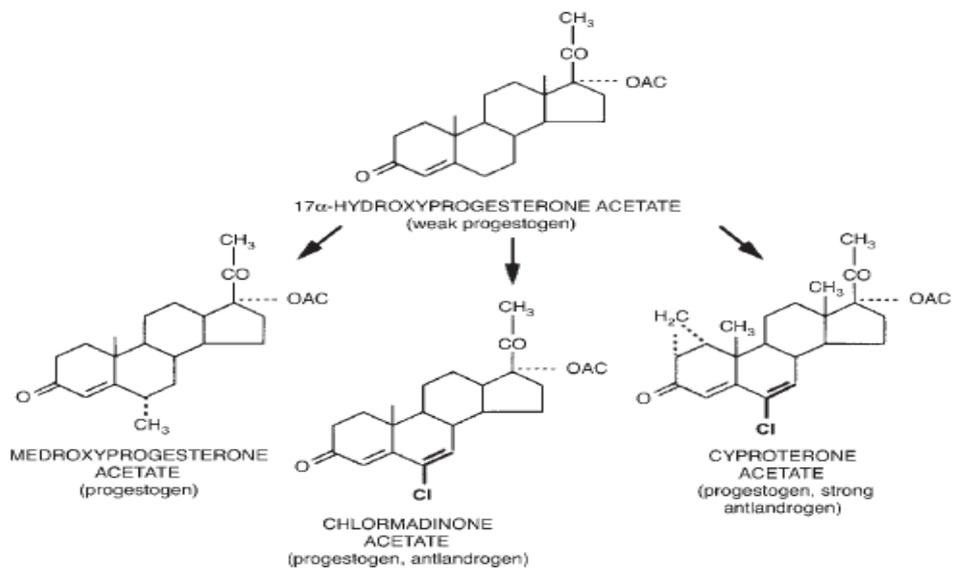
MPA dimetabolisme dalam tubuh hampir lengkap dalam satu jalur ke hepar oleh CYP3A4 . Progesteron di hepar akan mengalami metabolisme menjadi pregnandiol dan mengalami konjugasi dengan asam glukoronat dan sulfat yang nantinya akan disekresi melalui urin (Nelson, 2010).

#### 2.1.3.4. Ekskresi

Zat metabolit utama DMPA yaitu *6  $\alpha$ -methyl-6 $\beta$ , 17  $\alpha$ , 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  $\alpha$ -hidroksiprogesteron Asetat (17-Asetoksiprogesteron)**

Turunan 17 $\alpha$ -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  $13 \times 10^6$  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 (Juwon 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).

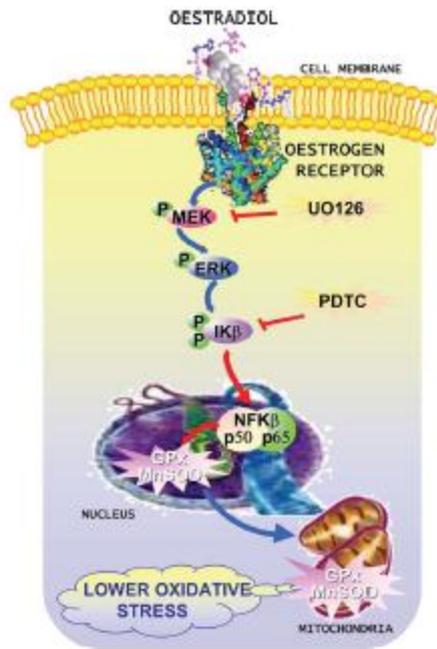
#### 2.1.7.2 Efeksamping jangka panjang

- 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  $17\beta$ -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 $\alpha$  ditemukan disebagian besar inti sekretori sel dihipofisis anterior dan tidak ditemukan di lobus intermediat dan posterior. ER $\beta$  tidak terdeteksi pada lobus hipofisis. Di tuba falopi dan uterus, ER $\alpha$  ditemukan dalam inti sel epitel serta dari stroma dan sel otot. ER $\beta$  mRNA ditemukan dalam sel-sel granulosa dari folikel yang tumbuh, sementara ER $\alpha$  terdapat dalam sel teka, sel-sel kelenjar interstitial dan epitel germinal. ER $\alpha$  dan ER $\beta$  terdeteksi di dalam ovarium. ER $\beta$  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 intraseluler 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 NF $\kappa$ B, 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.

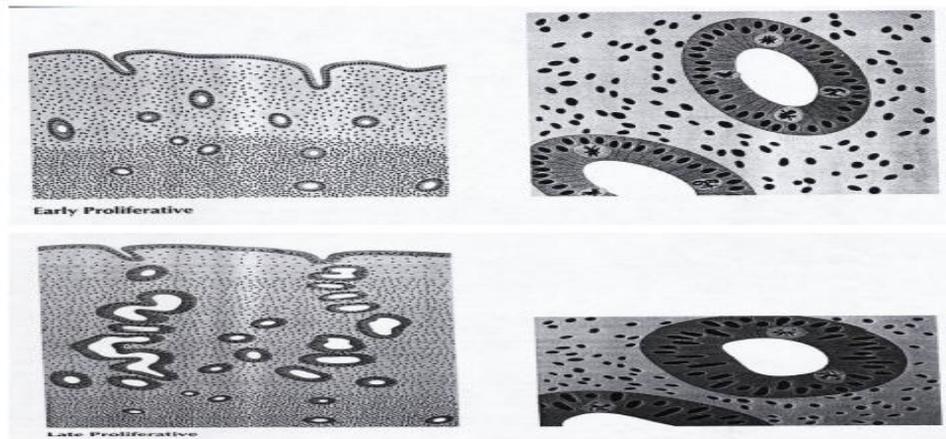
Jaringan padat namun tipis dan siklus antara fase proliferasi dan eksplorasi, pada saat menstruasi dua pertiga endometrium yang fungsional luruh. Semakin cepat kehilangan jaringan terjadi, semakin pendek durasi aliran menstruasi dan apabila tertunda maka akan kehilangan darah lebih besar.

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 reesus 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).

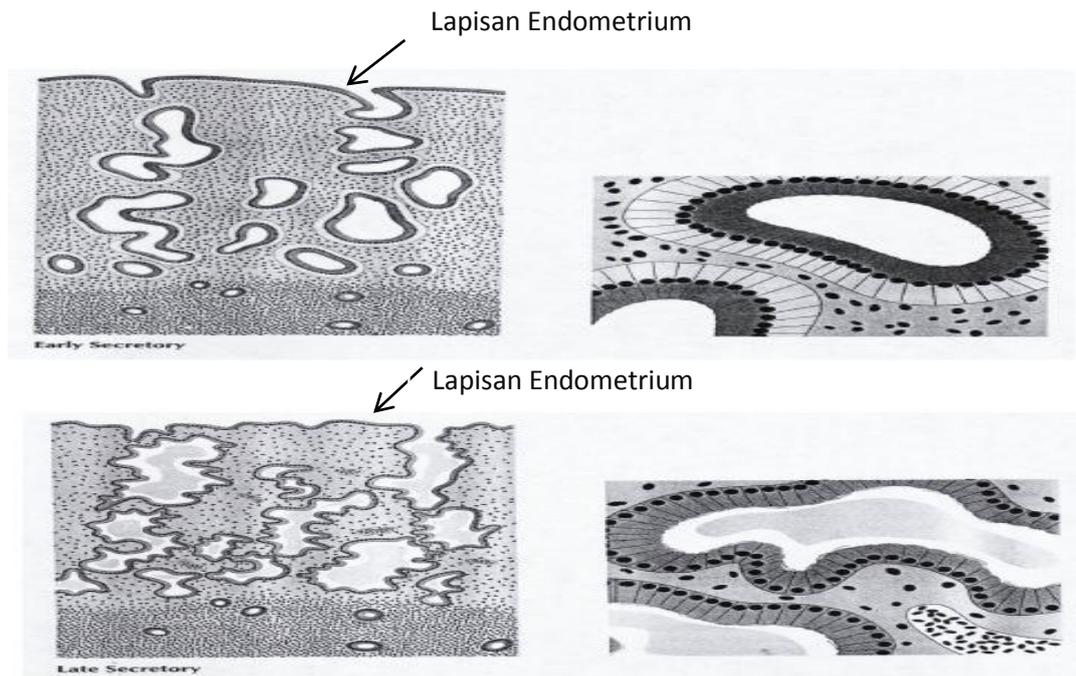


**Gambar 2.3 Endometrium pada Awal dan Akhir Fase Proliferasi**

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 atropi. 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).

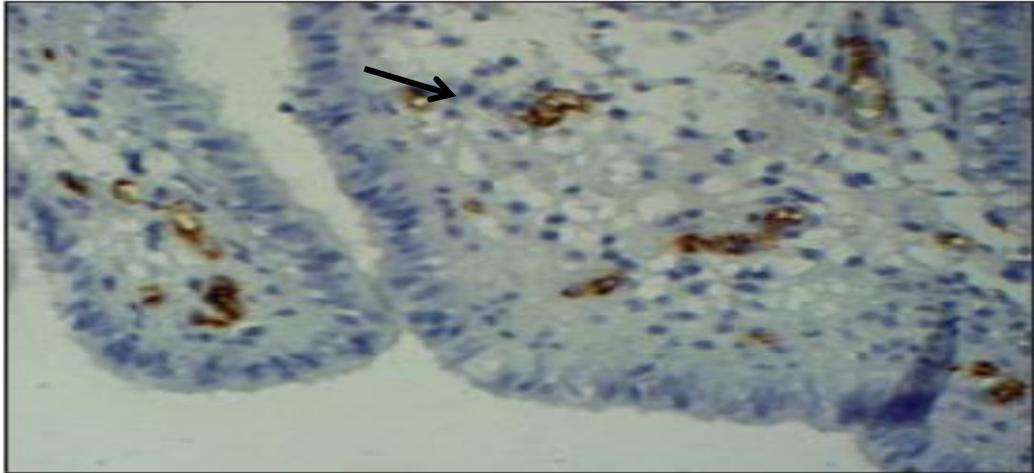
Peningkatan radikal bebas yang memicu stress oksidatif berkontribusi mekanisme gangguan perdarahan yang abnormal pada penggunaan kontrasepsi progestin jangka panjang dan menyebabkan pembesaran pembuluh darah yang abnormal pada tempat perdarahan, penipisan dan fragilitas pada dinding vaskular dan cenderung 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).

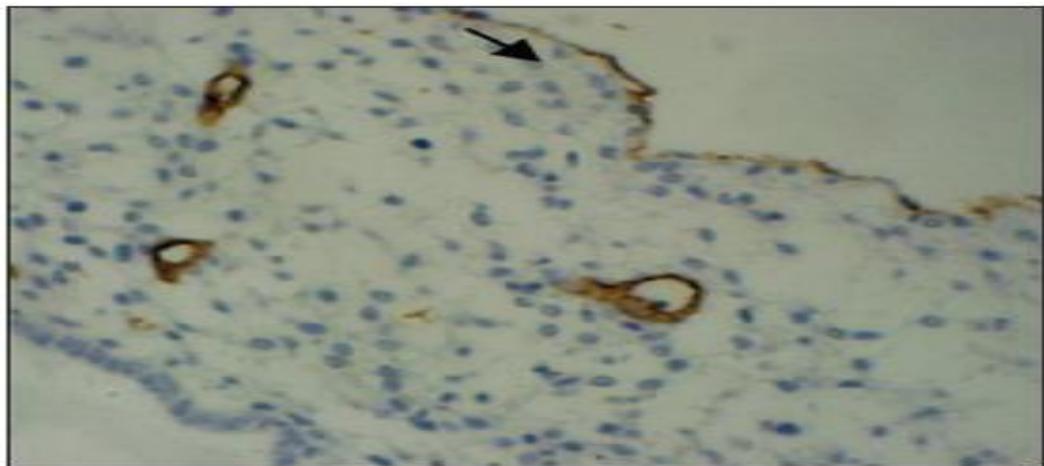
Pada pemakaian DMPA, endometrium menjadi dangkal dan atrofis dengan kelenjar-kelenjar yang tidak aktif. Sering stroma menjadi oedematous. Dengan pemakaian jangka-lama, endometrium dapat menjadi semakin sedikitnya, sehingga tidak didapatkan atau hanya didapatkan sedikit sekali jaringan bila dilakukan 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)

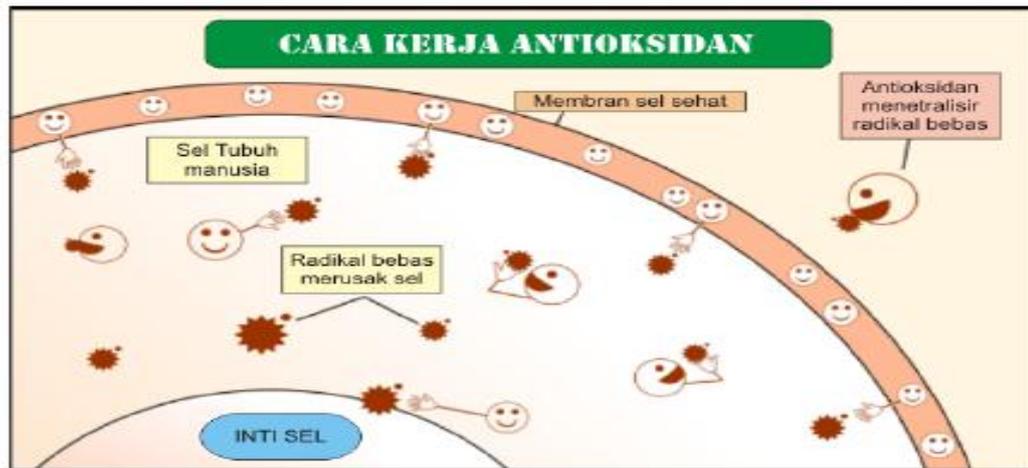
## **2.3 Antioksidan**

### **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 (Kaliora *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).

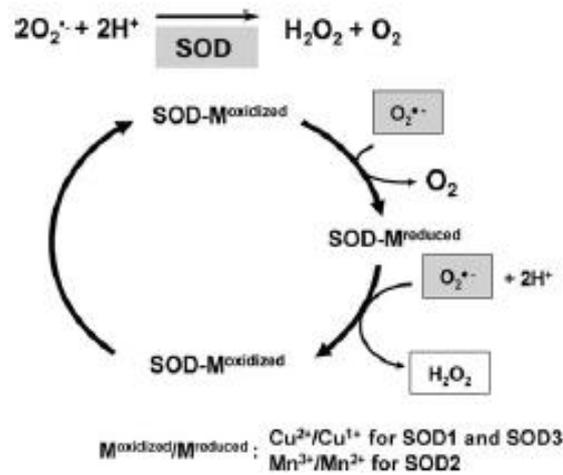
### 2.3.3 Jenis-Jenis Antioksidan

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

- 1) Primer (Endogenous) disebut antioksidan enzimatik misalnya SOD, katalase, serta glutathione peroxidase (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).

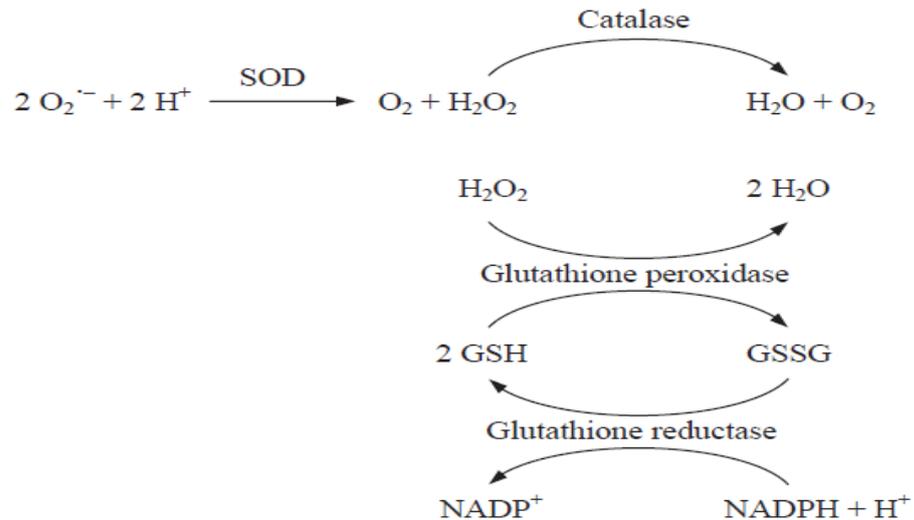


**Gambar 2.8 Mekanisme secara Umum Penangkapan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> oleh SOD**

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  $\text{O}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Selanjutnya  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang toksik dirubah menjadi  $\text{O}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  oleh katalase. GPx merubah  $\text{H}_2\text{O}_2$  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).

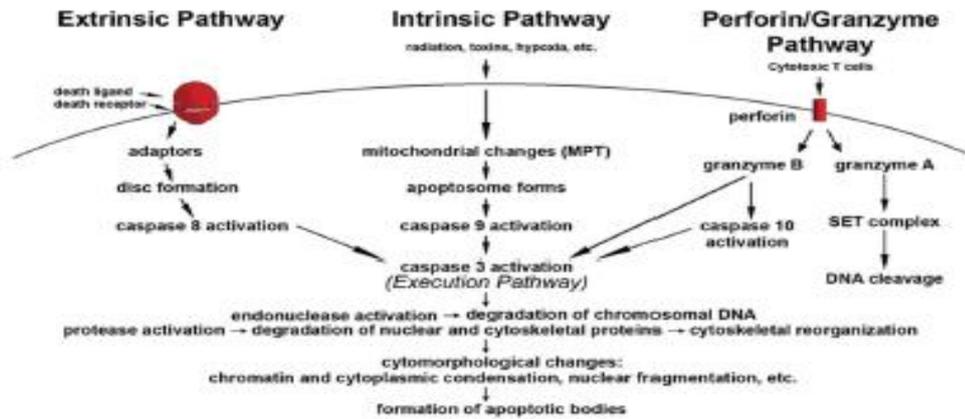
### 2.4.3 Proses Apoptosis

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 mengaktivasi 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 mengaktivasi caspase 9 , selanjutnya caspase 9 mengaktivasi 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 mengaktivasi jalur yang berbeda dan tidak

tergantung caspase. Granzime B mengaktifasi 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 mengaktifasi caspase 8, pada jalur intrinsik akan mengaktifasi caspase 9 dan pada jalur perforin/granzime akan mengaktifasi caspase 10, namun pada tahap eksekusi jalur tersebut akan bertemu pada titik yang sama yaitu pada caspase 3 teraktifasi 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 (Taatjes, *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 menciit 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). *Moringa* adalah akar kata dari banyak nama kelor (Krisnadi, 2015).

### **2.5.2 Klasifikasi**

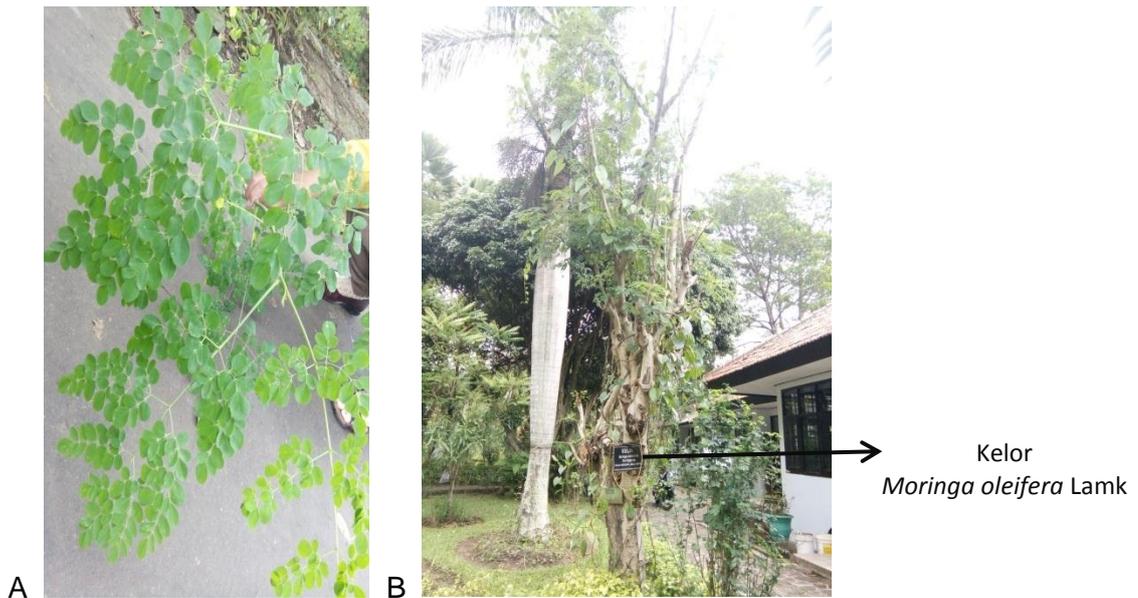
Kingdom kelor adalah plantae, Subkingdom: tumbuhan berpembuluh yang menghasilkan biji dan bunga, kelas berkeping dua atau dikotil, spesies *Moringa oleifera* Lam (Krisnadi, 2015).

### **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 <i>et al.</i> , 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 <i>et al.</i> , 2009	Tikus	Menginvestigasi potensi antioksidan dari beberapa fraksi daun kelor yang berbeda yaitu <i>diethyl ether fraction</i> , <i>crude extract</i> , <i>chloroform/non-phenolic fraction</i> , <i>ethyl acetate/polyphenolic fraction</i> dan <i>aqueous/residue fraction</i> dengan menggunakan berbagai sistem <i>in vitro</i> . Selanjutnya atas dasar sistem <i>in vitro</i> maka fraksi yang berpotensi sebagai antioksidan digunakan untuk perbaikan kerusakan DNA and kandungan antioksidan <i>in vivo</i> 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 <sub>4</sub> : 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 <sup>•</sup> dan menghambat toksisitas yang dihasilkan oleh CCl <sub>4</sub> 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 <sub>4</sub> .

Khalafalla <i>et al.</i> , 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 <i>in vitro</i>	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 <i>in vitro</i>	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 <i>kelor</i> baik daun matang dan daun muda memiliki aktivitas antioksidan yang sebanding dan hanya berbeda sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak <i>kelor</i> 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)



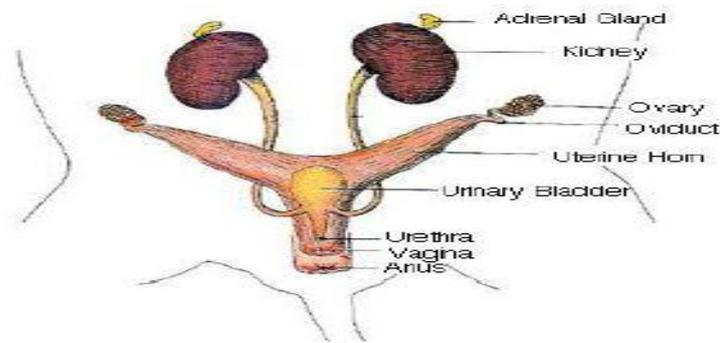
**Gambar 2.12** *Rattus norvegicus wistar*

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 ukurannya 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).