

NIKOTIN
- FOLLICULOGENESIS

KK
KKA
TKR 04/11
Noo
2

TESIS

EFEK NIKOTIN TERHADAP FOLIKULOGENESIS DAN KADAR ESTROGEN DARAH PADA MENCIT (*Mus musculus*)



Meitria Syahadatina Noor
NIM. 090810208 M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010

TESIS

**EFEK NIKOTIN TERHADAP FOLIKULOGENESIS DAN
KADAR ESTROGEN DARAH
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

Meitria Syahadatina Noor
NIM. 090810208 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**EFEK NIKOTIN TERHADAP FOLIKULOGENESIS DAN
KADAR ESTROGEN DARAH
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Tanggal Ujian Tesis : 29 Juli 2010

Oleh :

**Meitria Syahadatina Noor
NIM. 090810208 M**

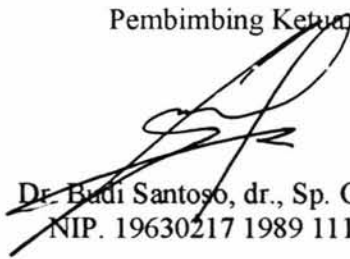
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 29 Juli 2010

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG. (K)
NIP. 19630217 1989 111 001

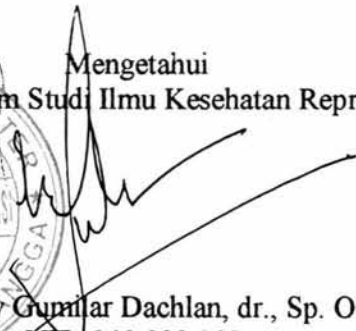
Pembimbing,



Dr. Bambang Poernomo, drh., MS.
NIP. 130 701 131

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi



Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp. OG. (K)
NIP. 140 092 103

Telah diuji pada
Tanggal 29 Juli 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Dr. Rina Judiwati, dr. MS.
- Anggota : 1. Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG. (K).
2. Dr. Bambang Poernomo, drh., MS.
3. Dr. Aditiawarman, dr., Sp. OG. (K).
4. Dr. Widati Fatmaningrum, dr., M. Kes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala kasih sayang dan kemudahan yang diberikan-Nya sehingga tesis ini dapat selesai dan memberikan manfaat untuk diri saya sendiri dan orang lain yang membacanya.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya diucapkan untuk Dr. Budi Santoso, dr., Sp. OG. (K) selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, saran, dan kritik yang membangun dari awal penulisan proposal hingga tesis ini selesai.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga diucapkan untuk Dr. Bambang Poernomo, drh., MS. selaku pembimbing yang sudah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan motivasi dengan penuh perhatian.

Saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga (Prof. Dr. H. Fasich, Apt.) atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga (Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS.) atas kesempatan menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Prof. Dr. Muhammad Amin, dr.Sp.P(K)) atas kesempatan yang diberikan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi FK Unair.
4. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat (dr. H. Hasyim Fachir, Sp. S) atas bantuan yang diberikan selama saya menempuh pendidikan di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
5. Ketua TKPSM Universitas Airlangga (Prof. Dr. Harjanto, dr., AIF. M. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjadi mahasiswa Program Magister di Unair.
6. Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Unair, Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp. OG. (K), atas segala masukan dan perhatiannya selama ini sehingga tesis ini dapat diselesaikan tepat waktu.
7. Dr. Widjiati, drh., MS., Prof. Dr. Laba Mahaputra, drh., MS. dan Dr. Dra. Dwi Winarni, MS., atas semua bantuan dan bimbingan selama melaksanakan penelitian karena tanpa bantuan mereka maka pelaksanaan penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik.
8. Dr. Rina Judiwati, dr. MS., Dr. Aditiawarman, dr., Sp. OG. (K), dan Dr. Widati Fatmaningrum, dr., M. Kes. selalu penguji tesis atas segala masukan yang diberikan.
9. Tim Laboratorium Invitro FKH Unair, Laboratorium Endokrinologi FKH Unair, dan Laboratorium Biologi FSAINTEK Unair yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

10. Kedua orangtua saya (dr. H. Bachran Noor Bahtiar dan Hj, Sulastri), adik-adikku (Ocha, Rahmat, Ria) dan seluruh keluarga yang telah memberikan doanya hingga saya berhasil menyelesaikan studi ini.
11. Spesial untuk Ocha sekeluarga atas kesediaannya memberikan tempat bernaung yang nyaman, terima kasih untuk Reyhan yang ganteng, telah memberiku kesempatan menjadi seorang pengasuh, semoga kelak aku bisa menjadi ibu yang baik dan memiliki anak sepintar dirimu.
12. Spesial untuk Mas RB. Wibi Harsono, terima kasih atas semua kasih sayang, dukungan dan kesabarannya selama ade menjalani studi ini, terima kasih atas begitu banyak senyum dan tawa serta telah menghilangkan banyak kesedihan.
13. Teman-teman IKR 2008: Bu Sum, Mbak Yayuk, Mbak Iis, Mbak Win, Mbak Lestari, Mbak Henny dan Dina. Memori yang begitu indah bersama kalian semua, semoga selalu menjadi kenangan indah untuk kita semua.
14. Semua pihak yang telah banyak membantu studi saya hingga tesis ini selesai, yang namanya tidak dapat disebutkan satu-persatu

Saya sebagai manusia biasa yang tidak lepas dari salah dan khilaf, memohon maaf kepada semua pihak atas segala kekurangan dan kesalahan yang pernah saya perbuat.

Surabaya, Juli 2010

Meitria Syahadatina Noor

RINGKASAN

EFEK NIKOTIN TERHADAP FOLIKULOGENESIS DAN KADAR ESTROGEN DARAH PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Jumlah perokok di Indonesia semakin meningkat. Persentase wanita yang merokok meningkat dari 1,3% pada tahun 2001 menjadi 4,5% pada tahun 2008. Komponen utama rokok adalah nikotin. Nikotin merupakan senyawa pro-oksidan yang terdapat pada tembakau. Tembakau mengandung 10-14 mg nikotin. Nikotin merupakan senyawa alkaloid, bersifat toksik dan diserap secara cepat di saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit. Nikotin yang terserap saat merokok adalah 1-1,5 mg. Nikotin diserap secara sistemik sebesar 0,3-2 mg selama merokok, yaitu 80-90% dari nikotin yang terkandung di dalam rokok. Perokok pasif akan menyerap nikotin hingga sebesar 60-80%. Nikotin yang masuk selama merokok tergantung dari volume rokok yang diisap, dalamnya inhalasi, komposisi udara di ruangan, dan intensitas isapan.

Nikotin yang terkandung dalam rokok (2 mg/batang) dan dihisap selama 5 menit akan menyebabkan kadarnya di dalam darah 15-30 ng/ml dengan bioavailabilitas 80-90%. Nikotin yang diberikan secara subkutan akan menyebabkan kadarnya di dalam darah 15 ng/ml dengan bioavailabilitas 100%.

Sebesar 70-80% nikotin akan diubah menjadi kotinin. Kotinin sebagai hasil metabolit nikotin terdeteksi di cairan folikel dan sel granulosa-luteal ovarium. Nikotin akan berikatan dengan reseptor asetilkolin di sistem saraf pusat setelah masuk ke dalam sirkulasi tubuh, yang akan meningkatkan stres oksidatif di mitokondria. Organel ini berperan dalam biosintesis hormon steroid. Nikotin dapat masuk ke dalam cairan folikel melalui proses difusi dari pembuluh darah karena barrier darah-folikel permeabel terhadap nikotin.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek nikotin terhadap folikulogenesis dan kadar estrogen darah mencit. Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental. Jenis rancangannya adalah *post test only control group design*. Subjek penelitian terdiri dari 4 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. Satu kelompok sebagai kontrol (K0) dan 3 kelompok lainnya sebagai kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 7 hari dengan dosis yang berbeda, yaitu 3 mg/kgBB (K1), 6 mg/kgBB (K2) dan 12 mg/kgBB (K3). Pengamatan akhir adalah menghitung jumlah dan diameter folikel ovarium serta kadar estrogen darah mencit.

Hasil perhitungan folikel ovarium mencit terdiri dari folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf. Rerata jumlah folikel primer untuk K0 = 104.4444, K1 = 88.7778, K2 = 56.6111, dan K3 = 56.1667. Rerata jumlah folikel sekunder untuk K0 = 85, K1 = 79.5556, K2 = 44.2222, dan K3 = 55.7778. Rerata jumlah folikel tersier untuk K0 = 56.1667, K1 = 36.7222, K2 = 22.8889, dan K3 = 32.2222. Rerata jumlah folikel de Graaf untuk K0 = 20.0556, K1 = 9.3333, K2 = 6, dan K3 = 10.3889.

Rerata diameter folikel primer untuk K0 = 4.2656, K1 = 3.4956, K2 = 4.6717, dan K3 = 3.4322. Rerata diameter folikel sekunder untuk K0 = 9.3606, K1 = 10.9111, K2 = 10.7117, dan K3 = 10.7172. Rerata diameter folikel tersier untuk K0 = 16.3606, K1 = 17.6694, K2 = 16.2806, dan K3 = 16.0956. Rerata diameter

folikel de Graaf untuk K0 = 16.8561, K1 = 15.5060, K2 = 14.9839, dan K3 = 16.6456.

Hasil perhitungan kadar estrogen darah mencit yang terdeteksi hanya pada kelompok K2. Rerata kadar estrogen darah mencit pada kelompok tersebut adalah 8 pg/ml.

Seluruh data berada dalam distribusi normal dan memiliki varians yang homogen, sehingga dapat diuji dengan analisis parametrik. Uji komparasi yang digunakan adalah uji Anava satu arah pada taraf kepercayaan 95%. Hasil uji Anava satu arah adalah jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf memiliki perbedaan yang bermakna secara statistik pada berbagai kelompok perlakuan ($p < 0,05$), sehingga dilanjutkan dengan uji BNT. Jumlah folikel tersier tidak berbeda secara bermakna pada berbagai kelompok perlakuan ($p > 0,05$). Hasil uji Anava satu arah untuk diameter folikel ovarium adalah tidak ada perbedaan yang bermakna untuk semua diameter folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf pada berbagai kelompok perlakuan ($p > 0,05$). Data kadar estrogen darah tidak dapat dilakukan uji komparasi karena nilainya konstan nol pada tiga kelompok.

Hasil uji BNT untuk pasangan kelompok yang berbeda secara bermakna dari hasil folikel primer adalah K0 dan K2, K0 dan K3, K1 dan K2, serta K1 dan K3. Pasangan berbeda bermakna untuk folikel sekunder adalah K0 dan K2, K0 dan K3, serta K1 dan K2. Pasangan berbeda bermakna untuk folikel de Graaf adalah K0 dan K1, K0 dan K2, serta K0 dan K3.

Hasil uji korelasi Pearson untuk jumlah folikel ovarium dengan kadar estrogen darah dan diameter folikel ovarium dengan kadar estrogen darah akibat pajanan nikotin sama-sama tidak menunjukkan adanya korelasi yang signifikan. Kekuatan korelasi kedua faktor tersebut dengan kadar estrogen darah sama-sama masih belum kuat (kekuatan korelasi $< 0,60$).

Penelitian ini membuktikan bahwa nikotin menyebabkan penurunan jumlah folikel ovarium mencit, tapi belum menyebabkan penurunan ukuran diameter folikel. Rerata kadar estrogen darah mencit akibat pajanan nikotin adalah 8 pg/ml (di bawah nilai normal), belum terdapat korelasi antara jumlah dan diameter folikel ovarium akibat pajanan nikotin dengan kadar estrogen darah. Saran yang diberikan adalah agar kebijakan konsumsi rokok harus lebih diperhatikan untuk menghindari efek negatif yang lebih lanjut, yaitu dengan membuat/mengoptimalkan UU tentang konsumsi rokok, sehingga dapat meminimalkan salah satu faktor risiko infertilitas pada wanita. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk menyempurnakan hasil penelitian ini.

SUMMARY

EFFECT OF NICOTINE ON FOLLICULOGENESIS AND BLOOD ESTROGEN LEVEL IN MICE (*Mus musculus*)

The number of smokers in Indonesia keeps increasing. The percentage of women smokers were increased from 1.3% in 2001 to 4.5% in 2008. The major component of cigarette is nicotine. Nicotine is a pro-oxidant compound found in tobacco. Tobacco contains 10-14 mg of nicotine. Nicotine is an alkaloid compound, it is toxic and can be absorbed quickly through the mucose of respiratory tract, mouth and skin. There is 1-1.5 mg nicotine absorbed while smoking. There is 0.3-2 mg nicotine absorbed into blood circulation while smoking, which is 80-90% of nicotine contained in cigarette. Passive smoker may absorb up to 60-80% nicotine. Nicotine inhaled while smoking depends on the volume of smoke inhaled, the depth of inhalation, the composition of air in the room, and the intensity of smoke inhalation.

There is 2 mg nicotine in one cigarette. When it is smoked for 5 minutes, its level in blood will become 15-30 ng/mL with 80-90% bioavailability. Subcutaneous nicotine will cause its level in blood become 15 ng/mL with 100% bioavailability.

Around 70-80% of nicotine will be changed into cotinine. Cotinine as metabolite of nicotine can be detected in follicular fluid and granulosa-lutein cells of ovarium. Nicotine will be bound with acetylcholine receptor in central nervous system after it enters the blood circulation. It will increase oxidative stress in mitochondria. The organelle's function is biosynthesis of steroid hormone. Nicotine may enter the follicular fluid by diffusion from blood vessel, because the blood-follicle barrier is permeable to nicotine.

The objective of this research was to study the effect of nicotine on folliculogenesis and blood estrogen level in mice. It was an experimental research, with post-test only with control group design. Subjects were classified into four random and homogenous groups. One group was the control (K0) and three others were treatment groups who were given subcutaneous injection of nicotine for 7 days with doses as follows: 3 mg/kgBW (K1), 6 mg/kgBW (K2), and 12 mg/kgBW (K3). The number of follicles were calculated, and the diameter of follicles and blood estrogen level in mice were measured.

Ovarian follicles of the mice consisted of primary, secondary, tertiary, and de Graaf follicles. The average number of primary follicles for K0 = 104.4444, K1 = 88.7778, K2 = 56.6111, and K3 = 56.1667. The average number of secondary follicles for K0 = 85, K1 = 79.5556, K2 = 44.2222, and K3 = 55.7778. The average number of tertiary follicles for K0 = 56.1667, K1 = 36.7222, K2 = 22.8889, and K3 = 32.2222. The average number of de Graaf follicles for K0 = 20.0556, K1 = 9.3333, K2 = 6, and K3 = 10.3889.

The average diameter of primary follicles for K0 = 4.2656 μm , K1 = 3.4956 μm , K2 = 4.6717 μm , and K3 = 3.4322 μm . The average diameter of secondary follicles for K0 = 9.3606 μm , K1 = 10.9111 μm , K2 = 10.7117 μm , and K3 = 10.7172 μm . The average diameter of tertiary follicles for K0 = 16.3606 μm , K1 = 17.6694 μm , K2 = 16.2806 μm , and K3 = 16.0956 μm . The average diameter of

de Graaf follicles for K0 = 16.8561 μm , K1 = 15.5060 μm , K2 = 14.9839 μm , and K3 = 16.6456 μm .

Blood estrogen level that could be detected was only from Group K2. The average level of blood estrogen in K2 was 8 pg/mL.

All data were normally distributed and had homogenous variance, so that the data were analyzed with parametric analysis. Comparison test used was one-way Anova with 95% confidence level. Result showed that there was a significant difference between the numbers of primary, secondary and de Graaf follicles in the four groups ($p < 0.05$), and the analysis were be continued with LSD test. There was no significant difference between the numbers of tertiary follicles in the four groups ($p > 0.05$). There was no significant difference between the diameters of primary, secondary, tertiary and de Graaf follicles in the four groups ($p > 0.05$). The data of blood estrogen level could not be statistically analyzed because the data in the three groups were zero.

LSD test showed that there was significantly difference between primary follicles of K0 and K2, K0 and K3, K1 and K2, K1 and K3; there was significant difference between secondary follicles of K0 and K2, K0 and K3, K1 and K2; and there was significant difference between de Graaf follicles of K0 and K1, K0 and K2, K0 and K3.

Analysis throughly Pearson correlation test showed that there was no significant correlation between the number and diameter of ovarian follicles with blood estrogen level after nicotine's exposure. The correlation was not strong enough (correlation coefficient was < 0.60).

This research showed that nicotine caused a decrease in the number of ovarian follicles in mice, but did not affect their diameters. The average level of blood estrogen caused by exposure of nicotine was 8 pg/mL (below normal value). There was no correlation between the number and diameter of ovarian follicles with blood estrogen level after nicotine's exposure.

It was suggested that the policy of cigarette consumption must be imposed to avoid negative effects of nicotine, by developing/optimizing the laws of cigarette consumption, to minimize one of the risks of infertility in women. Further research should be conducted to complete this study.

ABSTRAK

EFEK NIKOTIN TERHADAP FOLIKULOGENESIS DAN KADAR ESTROGEN DARAH PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Jumlah perokok di Indonesia semakin meningkat. Komponen utama rokok adalah nikotin. Nikotin merupakan senyawa oksidan yang dapat berdifusi ke dalam cairan folikel dan mempengaruhi folikulogenesis. Stress oksidatif yang terjadi juga dapat mengganggu biosintesis hormon steroid di mitokondria sel teka ovarium. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek nikotin terhadap folikulogenesis dan kadar estrogen darah mencit.

Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental. Jenis rancangannya adalah *post test only control group design*. Subjek penelitian terdiri dari 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K0), kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 7 hari dengan dosis 3 mg/kgBB (K1), 6 mg/kgBB (K2) dan 12 mg/kgBB (K3). Pengamatan akhir adalah menghitung jumlah folikel dan mengukur diameter folikel ovarium serta kadar estrogen darah mencit.

Hasil penelitian ini adalah terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf pada berbagai kelompok ($p < 0,05$). Hasil uji BNT untuk ketiga jenis folikel tersebut adalah terdapat perbedaan antara K0 dan K2, K0 dan K3, K1 dan K2, serta K1 dan K3 untuk folikel primer; K0 dan K2, K0 dan K3, serta K1 dan K2 untuk folikel sekunder; K0 dan K1, K0 dan K2, serta K0 dan K3 untuk folikel de Graaf. Diameter folikel tidak berbeda secara bermakna di antara beberapa kelompok ($p > 0,05$). Rerata kadar estrogen darah pada K2 adalah 8 pg/ml. Korelasi antara jumlah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah akibat pajanan nikotin dengan uji korelasi Pearson tidak bermakna dengan kekuatan korelasi $< 0,60$.

Kesimpulan penelitian ini adalah nikotin dapat menyebabkan penurunan jumlah folikel ovarium mencit, tapi belum dapat menyebabkan penurunan ukuran diameter folikel. Rerata kadar estrogen darah mencit akibat pajanan nikotin adalah 8 pg/ml (di bawah nilai normal). Jumlah dan diameter folikel ovarium dengan kadar estrogen darah akibat pajanan nikotin belum ada korelasi.

Kata kunci: nikotin, folikulogenesis, kadar estrogen darah

ABSTRACT

EFFECT OF NICOTINE ON FOLLICULOGENESIS AND BLOOD ESTROGEN LEVEL IN MICE (*Mus musculus*)

The number of smokers in Indonesia keeps increasing. The major component of cigarette is nicotine. Nicotine is an oxidant compound. It can diffuse into follicular fluid and affects folliculogenesis in ovarium. Oxidative stress is occurred because of nicotine, and disturbs the biosynthesis of steroid hormone in mitochondria of theca cells in ovarium. The objective of this research was to study the effect of nicotine on folliculogenesis and blood estrogen level in mice.

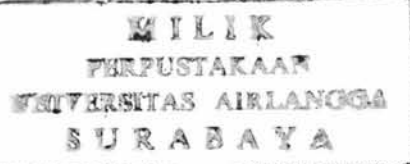
It was an experimental research, with post-test only with control group design. Subjects were divided into four groups, consist of control group (K0) and treatment groups who were given subcutaneous injection of nicotine for 7 days with doses as follows: 3 mg/kgBW (K1), 6 mg/kgBW (K2), and 12 mg/kgBW (K3), respectively the sum of follicles were calculated, the diameter of follicles and blood estrogen level in mice were measured.

Results showed that there were significantly differences between primary, secondary, and de Graaf follicles of the four groups ($p < 0.05$). LSD test showed that there was significant difference between primary follicles of K0 and K2, K0 and K3, K1 and K2, K1 and K3; there was significant difference between secondary follicles of K0 and K2, K0 and K3, K1 and K2; and there was significant difference between de Graaf follicles of K0 and K1, K0 and K2, K0 and K3. There were no significantly difference between the diameter of follicles in the four groups ($p > 0.05$). The average level of blood estrogen in K2 was 8 pg/mL. The correlation between the sum and diameter of follicles with blood estrogen level after nicotine's exposure was analyzed with Pearson correlation test, and there was no significantly correlation between them (correlation coefficient < 0.60).

The conclusions of this research were nicotine caused a decrease in the sum of follicles, instead the diameter. The average level of blood estrogen caused by exposure of nicotine was 8 pg/mL (below normal value). There was no correlation between the number and diameter of ovarian follicles with blood estrogen level after nicotine's exposure.

Keywords: nicotine, folliculogenesis, blood estrogen level

DAFTAR ISI



Halaman

Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan	viii
<i>Summary</i>	x
Abstrak	xii
<i>Abstrack</i>	xiii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	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
BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN.....	8
2.1 Rokok dan Nikotin.....	8
2.2 Folikulogenesis.....	13
2.3 Hormon Estrogen.....	22
2.4 Siklus Estrus Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	28
2.5 Efek Nikotin Terhadap Folikulogenesis dan Kadar Estrogen.....	30
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN....	33
3.1 Kerangka Konseptual.....	34
3.2 Hipotesis Penelitian.....	36
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	38
4.1 Rancangan Penelitian.....	38
4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	39
4.3 Variabel Penelitian.....	41
4.3.1 Klasifikasi Variabel.....	41
4.3.2 Definisi Operasional Variabel.....	42
4.4 Bahan Penelitian.....	44
4.5 Instrumen Penelitian.....	45
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	45
4.7 Prosedur Penelitian.....	46
4.7.1 Cara Pembuatan Larutan Nikotin.....	46
4.7.2 Cara Perlakuan dan Pengamatan.....	46
4.7.3 Cara Pemeriksaan Siklus Estrus Mencit.....	49
4.8 Kerangka Operasional.....	52

4.9 Analisis Data.....	53
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN.....	55
5.1 Data Penelitian.....	55
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian.....	62
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas.....	64
5.2.2 Hasil Uji Anava Satu Arah.....	65
5.2.3 Hasil Uji BNT.....	66
5.2.4 Hasil Uji Korelasi Pearson.....	67
BAB 6 PEMBAHASAN.....	68
6.1 Efek Nikotin terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	68
6.2 Efek Nikotin terhadap Diameter Folikel Ovarium Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	73
6.3 Efek Nikotin terhadap Kadar Estrogen Darah Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	75
6.4 Korelasi antara Jumlah dan Diameter Folikel dengan Kadar Estrogen Darah Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	78
BAB 7 PENUTUP.....	82
7.1 Kesimpulan.....	82
7.2 Saran.....	82
DAFTAR PUSTAKA.....	84
LAMPIRAN.....	89

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Perbedaan antara <i>initial recruitment</i> dan <i>cyclic recruitment</i>	15
Tabel 2.2 : Data biologi mencit (<i>Mus musculus</i>).....	30
Tabel 4.1 : Definisi operasional variabel.....	42
Tabel 4.2 : Nutrisi standar mencit.....	45
Tabel 5.1 : Hasil pemeriksaan swab vagina mencit.....	61
Tabel 5.2 : Jumlah folikel ovarium mencit.....	63
Tabel 5.3 : Diameter folikel ovarium mencit.....	63
Tabel 5.4 : Kadar estrogen darah mencit (pg/ml).....	64
Tabel 5.5 : Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas jumlah folikel ovarium mencit.....	64
Tabel 5.6 : Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas diameter folikel ovarium mencit.....	64
Tabel 5.7 : Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas kadar estrogen darah mencit.....	64
Tabel 5.8 : Nilai signifikansi (p) hasil uji homogenitas jumlah dan diameter folikel ovarium mencit.....	65
Tabel 5.9 : Nilai signifikansi (p) hasil uji beda antar kelompok.....	65
Tabel 5.10 : Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel primer ovarium mencit.....	66
Tabel 5.11 : Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel sekunder ovarium mencit.....	66
Tabel 5.12 : Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel de Graaf ovarium mencit.....	66
Tabel 5.13 : Korelasi antara jumlah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah mencit.....	67

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	: Metabolisme nikotin.....	10
Gambar 2.2	: Segitiga gunung folikel.....	14
Gambar 2.3	: Siklus folikel ovarium.....	15
Gambar 2.4	: Folikel primordial, preantral, antral dan preovulatori.....	17
Gambar 2.5	: Folikel sebelum dan setelah oosit keluar.....	19
Gambar 2.6	: Perkembangan dan atresia folikel pada ovarium mamalia.....	21
Gambar 2.7	: Awal pertumbuhan dan rupturnya folikel ovarium.....	22
Gambar 2.8	: Biosintesis estrogen.....	23
Gambar 2.9	: Tahapan steroidogenesis dan sintesis progesteron.....	24
Gambar 2.10	: Mekanisme konversi steroid.....	25
Gambar 2.11	: Konsep 2 sel dan 2 gonadotropin.....	26
Gambar 2.12	: Efek inhibin terhadap produksi FSH.....	27
Gambar 3.1	: Kerangka konseptual.....	34
Gambar 4.1	: Rancangan penelitian.....	39
Gambar 4.2	: Pengelompokan mencit berdasarkan kelompok perlakuan.....	41
Gambar 4.3	: Larutan nikotin yang sudah diencerkan.....	46
Gambar 4.4	: Pemeriksaan kadar estrogen darah dengan metode Elisa	49
Gambar 4.5	: Swab vagina.....	50
Gambar 4.6	: Hasil swab vagina mencit (pembesaran 400x).....	51
Gambar 4.7	: Kerangka operasional penelitian.....	52
Gambar 5.1	: Grafik jumlah folikel ovarium mencit pada semua kelompok perlakuan.....	55
Gambar 5.2	: Jumlah folikel primer (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	56
Gambar 5.3	: Jumlah folikel sekunder (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	56
Gambar 5.4	: Jumlah folikel tersier (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	57
Gambar 5.5	: Jumlah folikel deGraaf (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	57
Gambar 5.6	: Grafik diameter folikel ovarium mencit (μm) pada berbagai kelompok perlakuan.....	58
Gambar 5.7	: Diameter folikel primer (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	59
Gambar 5.8	: Diameter folikel sekunder (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	59
Gambar 5.9	: Diameter folikel tersier (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	60
Gambar 5.10	: Diameter folikel deGraaf (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE.....	60
Gambar 5.11	: Grafik kadar estrogen darah mencit (pg/ml) pada berbagai kelompok perlakuan.....	61

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Prosedur Pembuatan Larutan Nikotin.....	89
Lampiran 2 : Prosedur Pembuatan Preparat Histopatologi Ovarium...	91
Lampiran 3 : Prosedur pemeriksaan kadar estrogen darah dengan menggunakan metode Elisa.....	93
Lampiran 4 : Tabel data kasar jumlah folikel ovarium mencit.....	95
Lampiran 5 : Tabel data kasar diameter folikel ovarium mencit.....	96
Lampiran 6 : Tabel data kasar kadar estrogen darah mencit.....	97
Lampiran 7 : Hasil uji normalitas jumlah folikel ovarium.....	98
Lampiran 8 : Hasil uji normalitas diameter folikel ovarium.....	99
Lampiran 9 : Hasil uji normalitas kadar estrogen darah.....	101
Lampiran 10 : Hasil uji homogenitas.....	102
Lampiran 11 : Hasil uji Anava satu arah untuk jumlah folikel ovarium	103
Lampiran 12 : Hasil uji Anava satu arah untuk diameter folikel ovarium	104
Lampiran 13 : Hasil uji BNT jumlah folikel ovarium pada berbagai kelompok perlakuan.....	105
Lampiran 14 : Hasil uji korelasi Pearson.....	106
Lampiran 15 : Tabel konversi dosis.....	107
Lampiran 16 : Pelaksanaan penelitian.....	108
Lampiran 17 : Kurva hasil pemeriksaan Elisa untuk kadar estrogen darah	109
Lampiran 18 : Surat laik etik.....	110

DAFTAR SINGKATAN

AIF	:	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
Anava	:	Analisis varians
B[a]P	:	<i>Benzo-[a]-Pyrene</i>
BB	:	Berat Badan
BNT	:	Beda Nyata Terkecil
BSA	:	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CO	:	<i>carbonmonoxide</i>
CO ₂	:	<i>carbondioxide</i>
Depkes RI	:	Departemen Kesehatan Republik Indonesia
DHA	:	<i>Dehidroisoandrosteron</i>
DNA	:	<i>deoksiribonuklead acid</i>
dkk	:	dan kawan-kawan
ESHRE	:	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FBI	:	Forum Bebas Indonesia
FKH	:	Fakultas Kedokteran Hewan
FSAINTEK	:	Fakultas Sains dan Teknologi
FSH	:	<i>Follicles Stimulating Hormone</i>
GnRH	:	<i>Gonadotropine Releasing Hormone</i>
HCG	:	<i>Human Chorionic Gonadotropine</i>
HCl	:	<i>Hydrochloric acid</i>
HDL	:	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	:	Hematoksilin-Eosin
g	:	gram
GSH	:	<i>Glutation-S</i>
Kg	:	Kilogram
I125	:	Iodium 125
IU	:	<i>international unit</i>
IVF	:	<i>In Vitro Fertilization</i>
LDL	:	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LD ₅₀	:	<i>Lethal Dose 50</i>
LH	:	<i>Luteinizing Hormone</i>
Mg	:	Miligram
ml	:	Mililiter
Mm	:	Millimeter
μl	:	Mikroliter
N	:	Normalitas
NaCl	:	<i>Natrium Chloride</i>
NSB	:	<i>Non Specific Binding</i>
PAH	:	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PDAM	:	Perusahaan Daerah Air Minum
Pemkot	:	Pemerintah Kota
PMSG	:	<i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropine</i>
RIA	:	<i>Radio Immuno Assay</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>

Rp	:	Rupiah
RSU	:	Rumah Sakit Umum
SD	:	Standar Deviasi
Sitokrom P450sc	:	Sitokrom P450 <i>side-chain cleavage</i>
SOD	:	<i>Superoxide Dismutase</i>
StAR	:	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
TC	:	<i>Total Count</i>
Unair	:	Universitas Airlangga
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
3 β HSD	:	3 β -hidroksisteroid dehidrogenase

BAB I
PENDAHULUAN

BAB 1
PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Penelitian

WHO menyatakan terdapat 1,3 trilyun perokok di dunia pada tahun 2003 dan akan terus bertambah menjadi 1,7 trilyun pada tahun 2010, dan diperkirakan sekitar satu trilyun orang meninggal akibat merokok pada abad ke-21 (Rabinoff dkk., 2007). Persentase wanita usia reproduktif yang merokok diperkirakan sebesar 30% di salah satu negara maju yaitu Amerika Serikat (Bordel dkk., 2006).

Hasil survey WHO tahun 2008 menyatakan bahwa terdapat 65 juta perokok di Indonesia atau 28% dari jumlah penduduk, yang menempati urutan ketiga dari negara konsumen rokok di dunia setelah Cina dan India. Jumlah anak/remaja pria yang merokok di Indonesia adalah 24,1%, sedangkan anak/remaja wanita yang merokok adalah 4%. Pria dewasa yang merokok sebesar 63%, dan 4,5% wanita dewasa merokok. Jumlah wanita yang merokok di Indonesia tersebut mengalami peningkatan dari 1,3% pada tahun 2001 (Depkes RI dan WHO, 2003; FBI, 2009).

Rokok mengandung lebih dari 4000 komponen. Senyawa toksik yang terdapat pada rokok yaitu CO, nikotin dan PAH (WHO, 2000; Neal dkk., 2007; Vasquez, 2008). Komponen utama dari rokok adalah nikotin karena sekitar 50% rokok mengandung nikotin (Hukkanen dkk., 2005).

Seseorang yang merokok akan menyebabkan asap rokok tersebut terisap oleh orang yang merokok (perokok aktif) dan oleh orang yang tidak merokok yang berada di dekatnya (perokok pasif) (Fajriwan dan Jusuf, 1990; Vasquez, 2008). Rokok dapat mempengaruhi fekunditas dan fertilitas wanita karena memiliki efek

terhadap proses reproduksi termasuk produksi dan fungsi gamet, ovulasi, siklus reproduksi, fertilisasi, transport embrio dan implantasi (Bordel dkk., 2006). Konsumsi rokok yang tinggi dan bahaya yang ditimbulkan tersebut mendorong pemerintah mengeluarkan peraturan tentang rokok. Pemerintah Daerah Kota Surabaya mengeluarkan Peraturan Daerah No. 5 Tahun 2008 tentang kawasan tanpa rokok dan kawasan terbatas merokok (Pemkot Surabaya, 2008).

Risiko wanita yang merokok mengalami infertilitas 1,6 kali lebih besar daripada wanita yang tidak merokok (Augood dkk., 1998). Penyebab infertilitas pada usia kurang dari 30 tahun diduga berasal dari ovarium (Appasamy dkk., 2008). Kelainan endokrin juga merupakan penyebab infertilitas wanita yang utama (ESHRE, 2002). Penelitian Maheshwari dkk. (2008) menyatakan bahwa penyebab infertilitas terbanyak pada wanita usia kurang dari 35 tahun adalah kelainan ovarium yaitu sebesar 23,6%, sedangkan pada usia lebih dari/sama dengan 35 tahun adalah 11,4%.

Gangguan fungsi ovarium dilihat dari gangguan fungsi proliferasi (folikulogenesis) dan gangguan steroidogenesis (sintesis hormon estrogen). Gangguan ovarium yang tidak ditangani dapat menyebabkan amenore, perdarahan uterus disfungsi dan hirsutism. Semua gangguan tersebut merupakan masalah infertilitas yang banyak terjadi di masyarakat (ESHRE, 2002; Wiknjostastro, 1997).

Penelitian Chen dkk. (2005) menyatakan bahwa kandungan asap rokok bersifat anti estrogenik sehingga pada wanita yang terpajan asap rokok mengalami penurunan kadar estrogen urine. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Windham dkk. (2005) bahwa merokok mempengaruhi fungsi hormon wanita pada masa premenopause. Penelitian Zenzes dkk. (1997) melakukan pemeriksaan terhadap

kotinin (hasil metabolit nikotin) pada cairan folikel wanita yang menjalani IVF, terbukti menurunkan kemampuan untuk terjadi fertilisasi. Penelitian lain tentang nikotin secara *invivo* pernah dilakukan oleh Bordel dkk. (2006) dengan melakukan transplantasi folikel ovarium hamster di lipatan kulit dorsal hamster lain yang diberikan pajanan nikotin subkutan selama satu minggu. Hasil yang didapatkan adalah terjadi hambatan folikulogenesis. Penelitian tentang nikotin juga pernah dilakukan oleh Kakisina (2003) yang menggunakan pajanan nikotin 3, 6 dan 12 mg/kgBB, hasilnya mempengaruhi perkembangan embrio mencit.

Nikotin merupakan sumber utama pro-oksidan pada rokok (Paszkowski dkk., 2002). Stres oksidatif yang terjadi akan menyebabkan apoptosis sel granulosa dari folikel di ovarium. Apoptosis tersebut akan menyebabkan folikel menjadi atresia, degeneratif dan jumlahnya berkurang. Gangguan tersebut juga dapat menyebabkan gangguan sintesis hormon steroid seperti estrogen (Bordel dkk., 2005; Agarwal dkk., 2008). Nikotin juga dapat menghambat sintesis estrogen di mitokondria sel teka dengan mengganggu fungsi StAR (Bose dkk., 2007).

Penelitian yang membuktikan adanya efek nikotin sebagai komponen terbesar rokok terhadap folikulogenesis dan kadar estrogen darah sebagai gambaran fungsi ovarium yang diamati langsung pada individu/hewan coba yang sama masih belum banyak dilakukan. Penelitian terdahulu hanya melakukan pemeriksaan kadar estrogen urine dari wanita yang terpajanan nikotin tapi tidak dilakukan pemeriksaan gambaran folikulogenesis. Penelitian terdahulu juga hanya melakukan pemeriksaan perkembangan folikel dari transplantasi folikel hamster berbeda di lipatan kulit hamster lain yang terpajanan nikotin (sumber folikel hamster dan hamster yang terpajanan nikotin berbeda), tapi tanpa dilakukan pemeriksaan

kadar estrogen. Penelitian ini berbeda dari penelitian sebelumnya, yaitu melakukan pemajanan nikotin terhadap mencit kemudian dilakukan pemeriksaan folikulogenesis dan kadar estrogen darah secara bersamaan pada hewan coba yang sama untuk mengamati korelasi dari variabel yang diteliti, sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Apakah jumlah folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih sedikit daripada kontrol?
2. Apakah diameter folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih kecil daripada kontrol?
3. Apakah kadar estrogen darah mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih rendah daripada kontrol?
4. Apakah terdapat korelasi antara jumlah folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit?
5. Apakah terdapat korelasi antara diameter folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mempelajari efek nikotin terhadap folikulogenesis dan kadar estrogen darah mencit.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Membuktikan jumlah folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih sedikit daripada kontrol.
2. Membuktikan diameter folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih kecil daripada kontrol.
3. Membuktikan kadar estrogen darah mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih rendah daripada kontrol.
4. Membuktikan korelasi antara jumlah folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit.
5. Membuktikan korelasi antara diameter folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan setelah penelitian ini dilaksanakan adalah:

1. Manfaat ilmiah

Manfaat ilmiah yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah:

- a. Didapatkan mekanisme nikotin terhadap penurunan jumlah folikel ovarium, dalam hal ini menggunakan mencit sebagai model penelitian. Hasil tersebut menggambarkan risiko terjadinya infertilitas akibat nikotin.
- b. Didapatkan dosis minimal nikotin yang dapat menyebabkan penurunan jumlah folikel primer dan sekunder ovarium mencit, yaitu 6 mg/kgBB. Dosis tersebut dapat dikonversi menjadi dosis untuk manusia sebagai gambaran dosis nikotin yang diisap manusia untuk menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder. Nikotin dosis 3 mg/kgBB belum dapat menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder ovarium mencit.
- c. Didapatkan dosis minimal nikotin yang dapat menyebabkan penurunan jumlah folikel de Graaf ovarium mencit, yaitu 3 mg/kgBB. Dosis tersebut dapat dikonversi menjadi dosis untuk manusia sebagai gambaran dosis nikotin yang diisap manusia untuk menurunkan jumlah folikel de Graaf.

2. Manfaat bagi pelayanan masyarakat

Manfaat untuk masyarakat luas yang dapat dirasakan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

- a. Masyarakat dapat mengetahui bahaya nikotin yang terkandung dalam asap rokok sehingga dapat dijadikan dasar motivasi untuk berhenti mengkonsumsi rokok karena dapat mempengaruhi fertilitas wanita.

- b. Memperkuat dasar pertimbangan pemerintah untuk mengeluarkan kebijakan tentang konsumsi rokok karena terbukti memberikan dampak negatif yang merugikan perokok aktif dan pasif.
- c. Masyarakat dapat melakukan pencegahan terjadinya stres oksidatif berlebih di dalam tubuh untuk mengurangi risiko timbulnya infertilitas terutama pada wanita, seperti penggunaan antioksidan.

3. Manfaat bagi pengembangan ilmu

Hasil penelitian ini diharapkan dapat sebagai landasan melakukan penelitian selanjutnya untuk mengetahui efek nikotin terhadap sistem reproduksi wanita, terutama efeknya terhadap organ ovarium. Kekurangan yang dianalisis dalam penelitian ini dapat sebagai masukan untuk keberhasilan penelitian mendatang, antara lain:

- a. Pemilihan besar dosis, selisih dosis nikotin antar perlakuan, dan lama paparan nikotin.
- b. Pengukuran kadar hormon dalam darah yang dianjurkan jika hewan coba berada pada fase diestrus saat pengorbanan adalah hormon progesteron darah.
- c. Menghitung lama siklus estrus yang terjadi akibat paparan nikotin, baik itu semua fase atau hanya pada fase tertentu sehingga dapat diketahui apakah terjadi perpanjangan siklus/tidak secara pasti, dan fase mana yang mengalami perpanjangan waktu.



BAB II
TINJAUAN KEPUSTAKAAN

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok dan Nikotin

Rokok dapat mempengaruhi fekunditas dan fertilitas wanita karena efeknya terhadap proses reproduksi termasuk produksi dan fungsi gamet, ovulasi, siklus reproduksi, fertilisasi, transport embrio dan implantasi (Bordel dkk., 2006). Akibat yang ditimbulkan adalah gangguan haid, komplikasi kehamilan, menurunkan fertilitas dan gangguan steroidogenesis wanita (Bose dkk., 2007).

Rokok terdiri dari lebih 4000 komponen kimia. Minimal 60 jenis bersifat karsinogenik seperti 4-aminofenil, 2-naftilamin, benzen, nikel dan berbagai senyawa PAH dan N-nitrosamin (Vasquez, 2008; WHO, 2000). Komponen rokok yang bersifat toksik terhadap saluran telur adalah fenol, kuinolin, indol, benzen, dan 2-siklopenten-1 (Riveles dkk., 2005). Komponen utama dari rokok adalah nikotin karena sekitar 50% rokok mengandung nikotin (Hukkanen dkk., 2005).

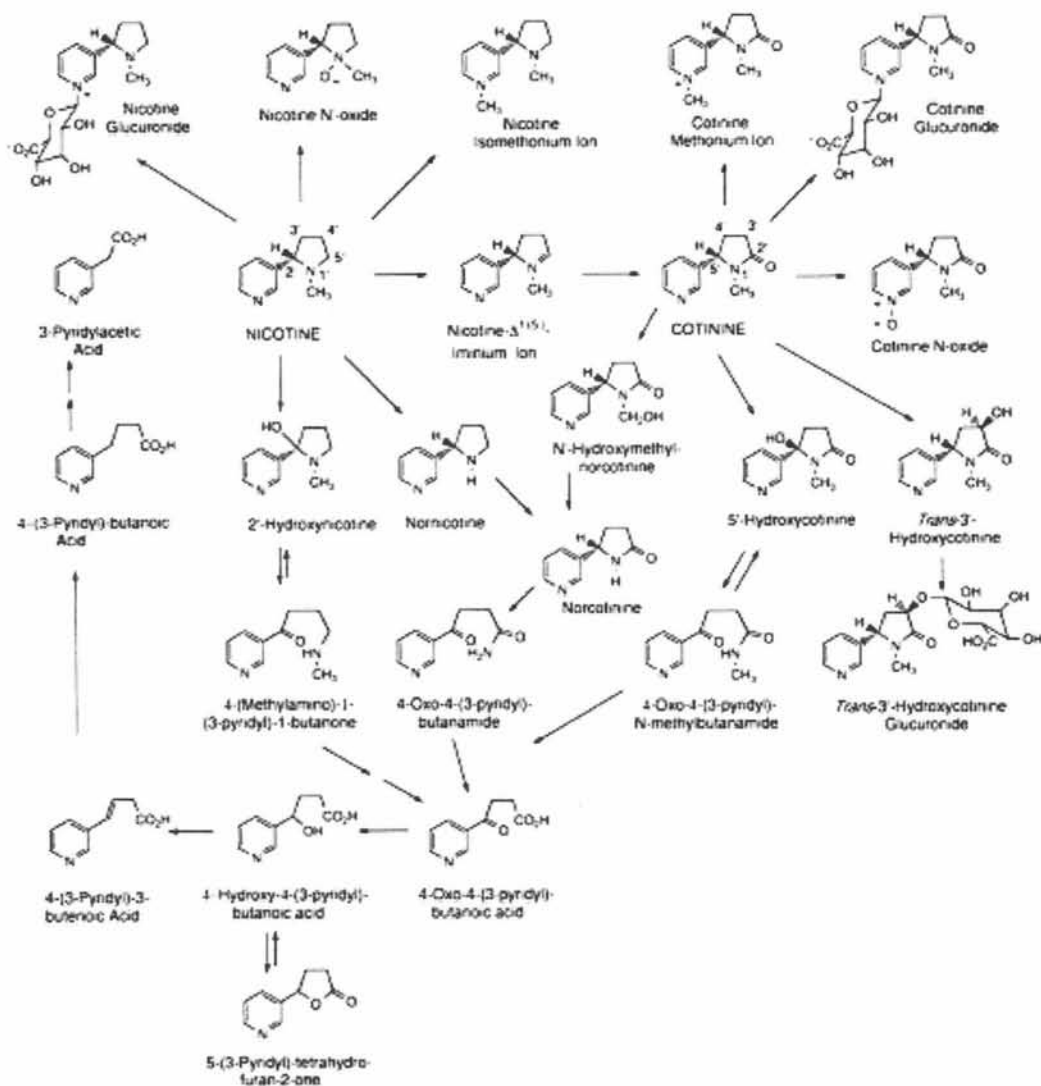
Nikotin merupakan senyawa yang terdapat pada tembakau. Tembakau mengandung 10-14 mg nikotin. Nikotin merupakan senyawa alkaloid, bersifat toksik dan diserap secara cepat di saluran pernafasan, mukosa mulut dan kulit. Nikotin yang terserap saat merokok adalah 1-1,5 mg. Absorpsi nikotin dipengaruhi oleh tingkat keasaman (pH). Efek nikotin akan lemah pada pH basa (pH 8). pH rokok diketahui bersifat cenderung asam yaitu 5,5-6. Nikotin akan diserap dengan cepat saat asap rokok mencapai alveolus diikuti dengan peningkatan kadar nikotin di sirkulasi darah. Nikotin diserap secara sistemik sebesar 0,3-2 mg selama merokok, yaitu 80-90% dari nikotin yang terkandung di

dalam rokok. Perokok pasif akan menyerap nikotin hingga sebesar 60-80%. Nikotin yang masuk selama merokok tergantung dari volume rokok yang diisap, dalamnya inhalasi, komposisi udara di ruangan, dan intensitas isapan. Nikotin akan memasuki sirkulasi darah setelah diserap dan akan didistribusikan ke jaringan tubuh (Hukkanen dkk., 2005; Miceli dkk., 2005).

Bentuk sediaan nikotin bervariasi, antara lain terdapat dalam rokok, spray hidung, permen karet, inhaler, tablet hisap, tablet sublingual, kapsul, larutan peroral, dan transdermal. Nikotin yang terkandung dalam rokok (2 mg/batang) dan diisap selama 5 menit akan menyebabkan kadarnya di dalam darah 15-30 ng/ml dengan bioavailabilitas 80-90%. Nikotin yang diberikan secara subkutan akan menyebabkan kadarnya di dalam darah 15 ng/ml dengan bioavailabilitas 100%. Absorpsi melalui kulit tergantung dengan permeabilitas kulit dan difusi melalui beberapa lapisan kulit. Absorpsi nikotin di lambung jelek karena mengalami ionisasi oleh asam lambung, tapi absorpsinya di usus halus lebih baik karena bersifat lebih basa dibandingkan dengan lambung. Bioavailabilitas nikotin secara oral sedikit dan tidak komplis karena setelah dari saluran cerna mengalami metabolisme pertama di hepar (Hukkanen dkk., 2005).

Nikotin akan masuk ke sirkulasi darah setelah diabsorpsi, yaitu pada pH 7,4, kemudian didistribusikan ke jaringan tubuh. Afinitas ikatan nikotin dengan jaringan otak tinggi dan kapasitas ikatan reseptornya lebih besar pada perokok daripada bukan perokok. Nikotin dapat mencapai otak 10-20 detik setelah merokok. Efek farmakologik nikotin tergantung dengan cara masuk dan dosis yang digunakan (Hukkanen dkk., 2005).

Sebesar 70-80% nikotin akan diubah menjadi kotinin. Perubahan tersebut dibantu oleh sitokrom P450 dan sitoplasmik aldehyd oksidase. Kotinin sebagai hasil metabolit nikotin terdeteksi di cairan folikel dan sel granulosis-luteal ovarium. Hasil metabolit nikotin lainnya adalah N-metil-nikotin atau disebut juga M-nikotin. Metabolisme nikotin (Gambar 2.1) terutama terjadi di hepar (80-90%), tapi dalam jumlah yang kecil dapat dimetabolisme di paru, ginjal, mukosa nasal dan otak (Hukkanen dkk., 2005; Miceli dkk., 2005).



Gambar 2.1 Metabolisme nikotin (Hukkanen dkk., 2005)

Beberapa faktor yang mempengaruhi metabolisme nikotin adalah faktor fisiologis, patologis, obat-obatan, jenis rokok, dan perbedaan ras dan etnik. Faktor fisiologis terdiri dari makanan, usia, farmakokinetik, dan perbedaan jenis kelamin. Konsumsi makanan selama merokok dapat menurunkan konsentrasi nikotin, terlihat setelah 30-60 menit makan. Usia lebih dari 65 tahun akan menurunkan kemampuan melakukan metabolisme nikotin. Farmakokinetik nikotin mengalami perbedaan 17% antara kadar tertinggi dan terendah di dalam darah. Metabolisme minimal terjadi sekitar pukul 18.00 sore hingga pukul 03.00 pagi. Jenis kelamin juga mempengaruhi metabolisme nikotin, yaitu lebih tinggi pada laki-laki daripada wanita (Hukkanen dkk., 2005).

Faktor patologis yang mempengaruhi metabolisme nikotin antara lain adalah hepatitis A, ingesti alkohol akut, gagal ginjal, dan trimetilaminuria. Kelainan tersebut dapat menurunkan metabolisme nikotin. Obat yang dapat menginduksi metabolisme nikotin adalah rifampisin, deksametason, dan fenobarbital, sedangkan obat yang dapat menghambat metabolisme nikotin adalah metoksalen, kumarin, triptamin dan neomentil tiol. Faktor ras dan etnik yang mempengaruhi metabolisme nikotin adalah ras kulit hitam memiliki metabolisme yang lebih rendah daripada kulit putih (Hukkanen dkk., 2005).

Nikotin akan memberikan efek jika kadarnya dalam darah mencapai 50-200 ng/ml, dapat masuk ke dalam tubuh langsung saat merokok atau melalui pemberian subkutan. Kadar nikotin tersebut berdasarkan penelitian pada hewan coba hamster, tidak bisa langsung disamakan dengan manusia karena adanya perbedaan katabolisme, merk yang digunakan dan kekuatan filter yang ada pada rokok yang digunakan oleh manusia. Kadar nikotin rata-rata 50 ng/ml di darah

sudah dicapai manusia setelah merokok beberapa batang. Dosis nikotin pada hewan coba hamster (usia 8 minggu dan berat badan 50-80 g) sebesar 0,2 mg/kgBB setara dengan merokok ringan 10 batang/hari dan 1 mg/kgBB setara dengan merokok berat 10-30 batang/hari (Bordel dkk., 2006).

Ekskresi nikotin dapat melalui ginjal, feses dan keringat. Perbedaan spesies memiliki kemampuan metabolisme yang berbeda. Urutan spesies yang memiliki kemampuan metabolisme total dari yang tertinggi adalah guinea pig, hamster, mencit, tikus, dan manusia (Hukkanen dkk., 2005). Dosis nikotin yang toksik untuk mencit adalah 12,5 mg/kg BB (Mailhes dkk., 2000). Dosis nikotin yang dapat menimbulkan kematian untuk mencit adalah 24 mg/kgBB, didapatkan dari uji pendahuluan LD₅₀ pada mencit galur Balb/C (Kakisina, 2003).

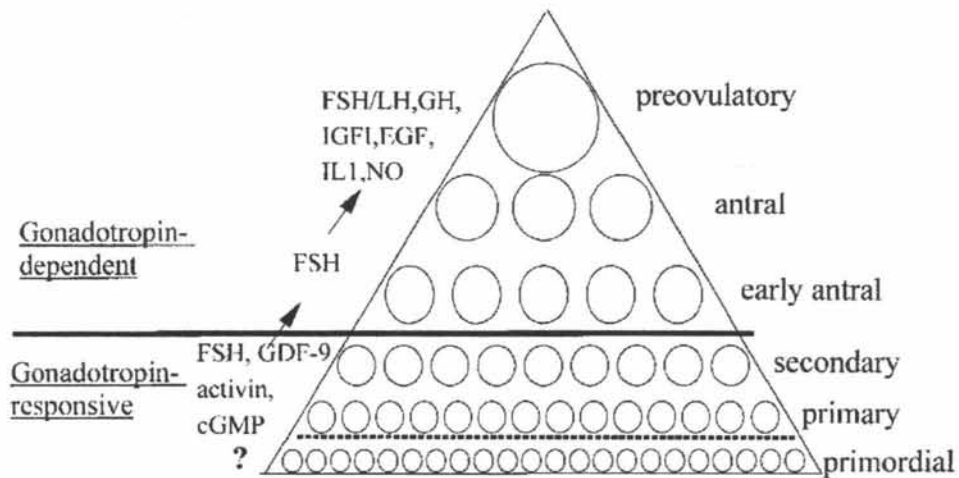
Rokok yang mengandung 0,5-1,6 mg nikotin/batang akan menyebabkan kandungan nikotin dalam darah sebesar 0,01 µg/ml (0,022 µM) dan di jaringan tubuh 1 µg/ml (2,2 µM). Nikotin akan berikatan dengan reseptor asetilkolin di sistem saraf pusat setelah masuk ke dalam sirkulasi tubuh, yang akan meningkatkan stres oksidatif di mitokondria. Organel ini berperan dalam biosintesis hormon steroid. Konsentrasi nikotin yang tinggi diperlukan untuk dapat mempengaruhi steroidogenesis karena hidrolisis nikotin yang cepat oleh jaringan tubuh. Dosis tinggi tersebut yaitu 5mM nikotin untuk dapat mengurangi sintesis pregnenolon hingga 75 ng/ml, yang penelitiannya dilakukan dengan menggunakan darah monyet. Nikotin dengan konsentrasi rendah tidak dapat mempengaruhi steroidogenesis (Bose dkk., 2007). Nikotin dapat masuk ke dalam cairan folikel melalui proses difusi dari pembuluh darah karena barrier darah-folikel permeabel terhadap nikotin (Fabro, 1978).

Nikotin adalah sumber pro-oksidan utama karena terdapat ROS dan radikal bebas dalam komponen gas dan partikel rokok. Ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Antioksidan dapat bersifat enzimatik (superoksid dismutase, katalase, glutathion peroksidase) dan non enzimatik (alfa tokoferol, asam askorbat, dan lain-lain). Proses oksidasi akan merusak struktur dan fungsi sel seperti lipid, protein dan DNA. Peroksidasi lipid adalah reaksi radikal bebas yang paling banyak terjadi. Stres oksidatif akibat rokok ini juga bisa terjadi di folikel ovarium sehingga akan mempengaruhi perkembangan folikel dan maturasi oosit (Paszkowski dkk., 2002).

2.2 Folikulogenesis

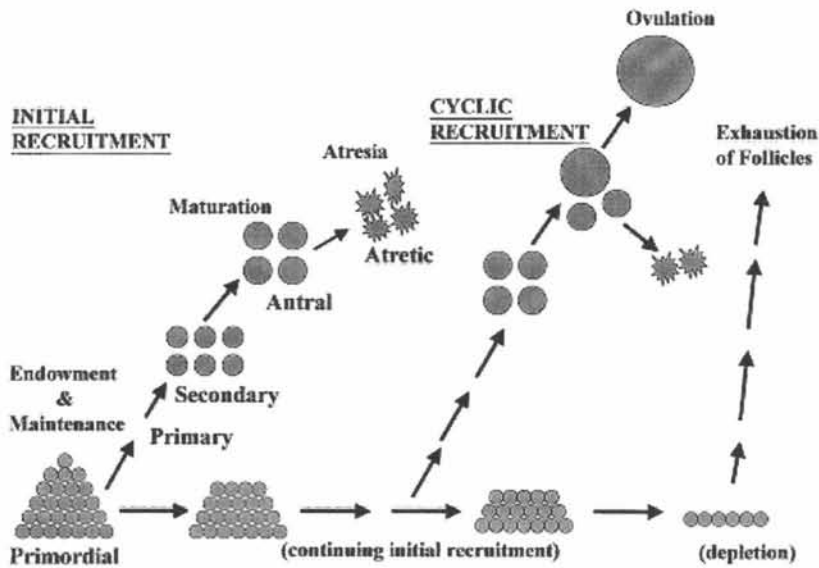
Pembentukan folikel manusia dimulai sejak usia kehamilan 20-22 minggu ketika terdapat selapis sel pipih mengelilingi oosit (Garor dkk., 2009). Tiap oosit yang dimiliki pada saat anak perempuan lahir masih dikelilingi oleh selapis sel granulosis yang disebut folikel primordial. Sel granulosis tersebut berfungsi sebagai sumber nutrisi oosit dan sekresi faktor penghambat maturasi oosit sehingga oosit tetap dalam fase profase miosis. Folikel primordial merupakan awal proses folikulogenesis. Folikulogenesis adalah proses perkembangan folikel dari folikel primordial menjadi folikel primer, sekunder (preantral), antral dan folikel de Graaf yang matur. Perkembangan folikel diawali dengan stadium tanpa tergantung gonadotropin (Gambar 2.2), yaitu perkembangan dari folikel primordial hingga folikel sekunder/preantral. Proses perkembangan tersebut menyebabkan respon hormonal yang teratur dan progresif sehingga menghasilkan folikel yang matang dan siap untuk ovulasi (stadium tergantung gonadotropin).

Proses enzimatik di dalam sel folikel diaktivasi oleh gonadotropin dan 17β estradiol (Guyton dan Hall, 1997; Mehring, 2003; Dharma dkk., 2009).



Gambar 2.2 Segitiga gunung folikel (McGee dan Hsueh, 2000)

Perkembangan folikel ovarium harus melewati 2 fase, yaitu *initial recruitment* dari folikel primordial hingga folikel preantral (tidak terpengaruh oleh gonadotropin), dan *cyclic recruitment* yang tergantung dengan gonadotropin untuk perkembangan yang cepat dari folikel preantral hingga folikel de Graaf yang matur. *Cyclic recruitment* menentukan terbentuknya folikel dominan untuk ovulasi (Dharma dkk., 2009). Proses tersebut digambarkan pada Gambar 2.3. Perbedaan kedua fase tersebut secara rinci dijelaskan pada Tabel 2.1.



Gambar 2.3 Siklus folikel ovarium (McGee dan Hsueh, 2000)

Tabel 2.1 Perbedaan antara *initial recruitment* dan *cyclic recruitment* (McGee dan Hsueh, 2000)

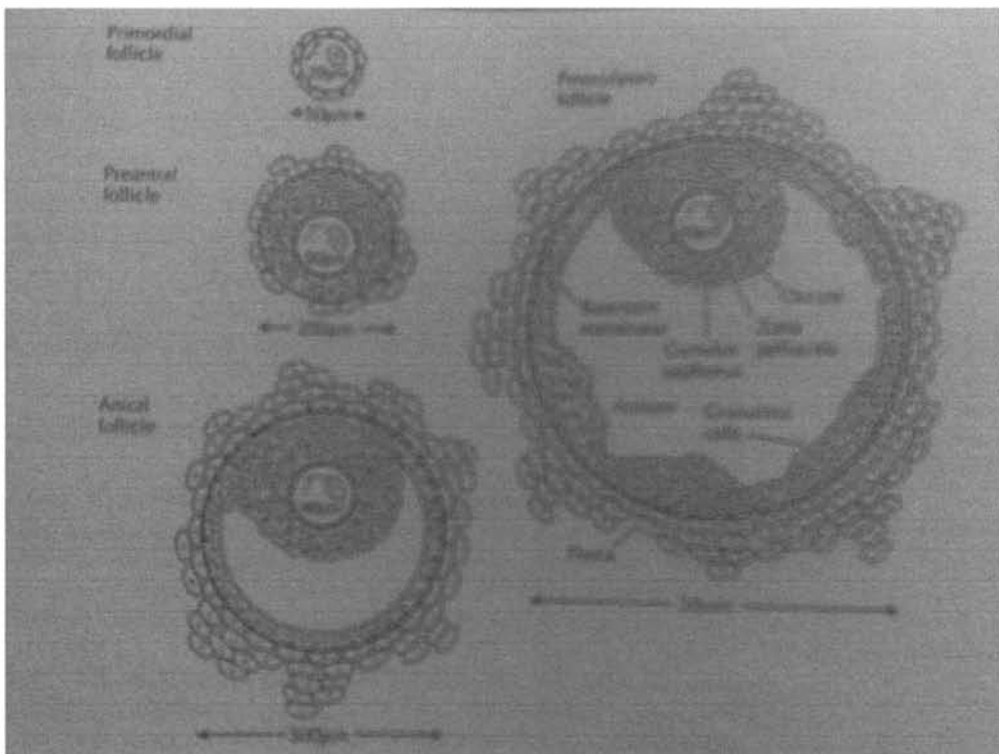
KETERANGAN	<i>INITIAL RECRUITMENT</i>	<i>CYCLIC RECRUITMENT</i>
Tahapan	Folikel primordial	Folikel antral (diameter pada manusia 2-5 mm, pada <i>rodent</i> 0,2-0,4 mm)
Hormon yang terkait	Tidak tergantung hormon	Tergantung FSH
Mekanisme yang terjadi	Masih belum aktif	Apoptosis
Waktu	Berlangsung terus-menerus sepanjang hidup, dimulai sejak folikel terbentuk	Berlangsung secara siklik (pada manusia 28 hari, rodent 4-5 hari), dimulai setelah pubertas
Kondisi oosit	Mulai tumbuh, belum bisa memasuki fase maturasi	Pertumbuhannya komplit, sudah dapat memasuki fase maturasi

Urutan yang terjadi dalam folikulogenesis adalah membesarnya ukuran oosit sehingga diameternya bertambah 2-3x lipat, sel granulosis mengalami replikasi dan perubahan dari pipih menjadi kuboid, kemudian folikel tumbuh menjadi folikel primer. Proses selanjutnya adalah terbentuknya zona pelusida, yaitu

lingkaran mukoid yang bening melingkupi oosit. Zona pellusida tetap ada hingga oosit yang dibuahi mencapai uterus. Proses terakhir adalah vaskularisasi sel teka interna dan dikelilingi oleh sel teka eksterna (Gant dan Cunningham, 1993; Cunningham dkk., 1995; Guyton dan Hall, 1997).

Awal perkembangan folikel berupa folikel primordial. Oosit di dalam folikel primordial berhenti berkembang pada fase diploten profase miosis, di sekelilingnya dilapisi 1 lapis sel skuamosa granulosis dan dikelilingi oleh membran basal. Sel folikel primordial berasal dari endoderm *yolk sac*, alantois, dan usus embrio, dan akan bermigrasi ke *genital ridge* pada minggu ke-5-6 kehamilan. Multiplikasi sel folikel dengan mitosis terjadi dengan cepat pada minggu ke-6-8 kehamilan. Pembentukan folikel primordial berawal pada pertengahan masa kehamilan dan komplit setelah lahir. Jumlah folikel primordial pada awal pembentukan adalah 6-7 juta, kemudian berkurang menjadi 1-2 juta saat lahir, dan 3000-5000 saat pubertas. Jumlah folikel yang mengalami ovulasi selama masa reproduksi wanita hanya 400-500 folikel (Dharma dkk., 2009; Speroff dan Fritz, 2005).

Folikel primordial akan berkembang dan sel yang mengelilingi stroma mengalami penggandaan dan menjadi lebih besar daripada sel yang mengelilingi jaringan ikat (Gambar 2.4). Ukuran folikel akan menjadi lebih besar, sel teka lutein mengandung lipid dan pigmen kekuningan sehingga sel menjadi bergranula dan terjadi peningkatan vaskularisasi dan jumlah ruang limfatik (Cunningham dkk., 1995).

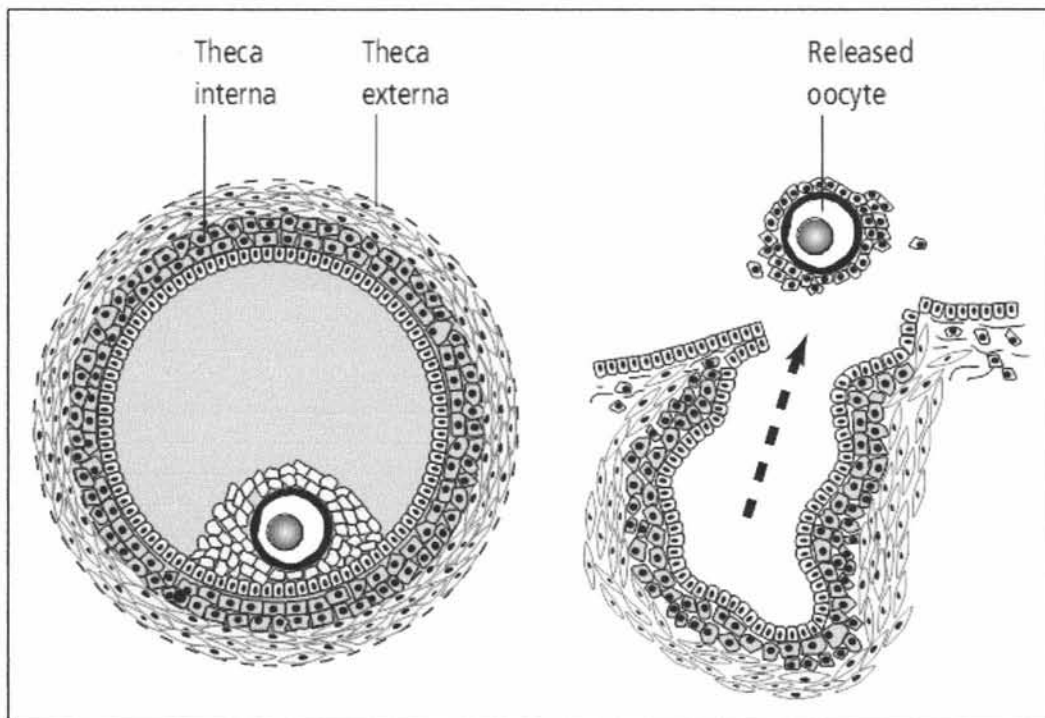


Gambar 2.4 Folikel primordial, preantral, antral dan preovulatori (Speroff dan Fritz, 2005)

Folikel primer akan terbentuk setelah folikel primordial, ditandai oleh perubahan lapisan pregranulosis menjadi kuboid sehingga oosit dikelilingi oleh selapis sel granulosis berbentuk kuboid. Diameter folikel primordial dan folikel primer sekitar 30-50 μm . Folikulogenesis dilanjutkan hingga terbentuk folikel preantral (folikel sekunder) dimana oosit dilapisi oleh 2-3 lapis sel granulosis kuboid dengan diameter folikel 0,1-0,2 mm. Proliferasi sel granulosa menjadi lebih lengkap pada fase ini dan terjadi pembentukan badan Call-Exner, disebut juga antrum. Lapisan sel teka minor mengalami diferensiasi. Folikel yang sudah memiliki antrum disebut sebagai folikel antral, terbentuk karena responsif terhadap gonadotropin khususnya FSH yang kadarnya mulai meningkat di awal siklus haid. Kadar FSH tertentu dapat mempercepat pertumbuhan 6-12 folikel primer. Folikel antral ditandai dengan lapisan sel teka dan vaskularisasi folikel.

Diameter folikel pada fase ini menjadi 0,2-0,4 mm (Sperof dan Frits, 2005; Dharma dkk., 2009; Garor dkk., 2009).

Folikel antral akan menjadi folikel de Graaf, ditandai dengan membesarnya sel stroma yang mengelilinginya, berisi cairan folikuli dan merapatnya jaringan kapiler di sekelilingnya dan membentuk lapisan teka interna, yaitu lapisan di bagian dalam (sel teka yang mengelilingi folikel) (Cunningham dkk., 1995; Sperof dan Frits, 2005). Sel tersebut memiliki karakteristik yang mirip dengan sel granulosa, yaitu dapat mensekresi hormon steroid. Lapisan luar disebut sebagai teka eksterna, yaitu kapsul jaringan ikat yang sangat vaskular yang akan berkembang menjadi kapsul dari folikel yang berkembang (Guyton dan Hall, 1997). Folikel de Graaf merupakan tempat sintesis hormon steroid terutama androstenedion yang merupakan prekursor pembentukan 17β estradiol di sel granulosa. Lapisan dinding folikel jenis ini jika dilihat dari luar ke dalam terdiri dari 1 lapis jaringan ikat khusus (teka folikuli), 1 lapis epitel (membrana granulosa), oosit, dan cairan folikuli yang mengisi folikel. Teka folikuli terdiri dari teka interna di lapisan bagian dalam dan teka eksterna di lapisan bagian luar (Gambar 2.5) (Gant dan Cunningham, 1993; Cunningham dkk., 1995).



Gambar 2.5 Folikel sebelum dan setelah oosit keluar (Hamilton dan Fairley, 2004)

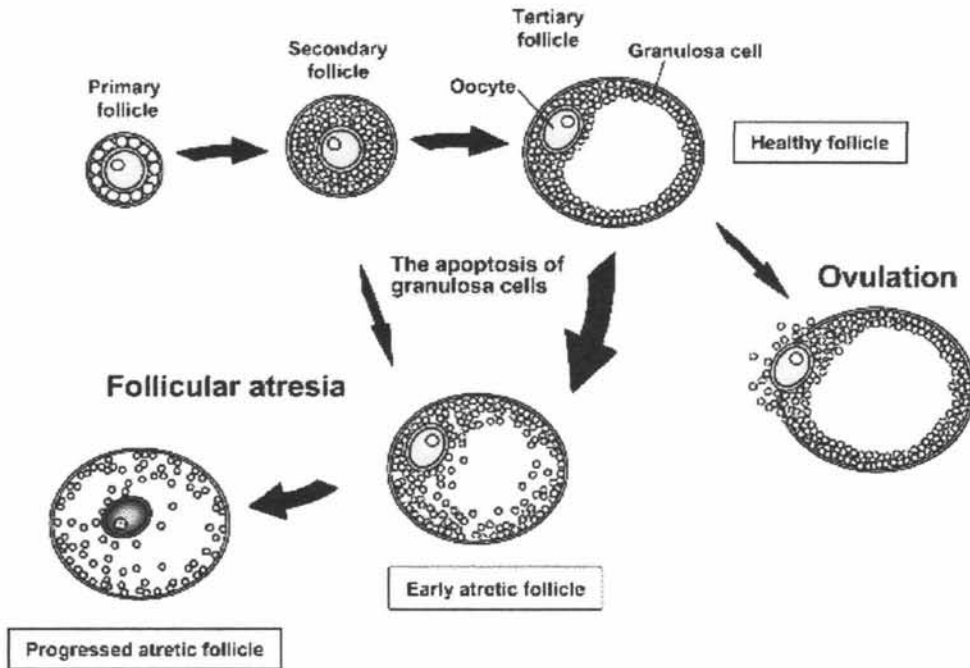
Membran granulosa terdiri dari lapisan sel poligonal/kuboid yang berisi nukleus bundar dan gelap, makin besar folikel maka jumlah lapisan membrana granulosa makin sedikit. Membran ini akan menjadi lebih tebal dari bagian lain dan membentuk gundukan yang di dalamnya terdapat oosit, yaitu kumulus ooforus (Cunningham dkk., 1995).

Folikel antral akan semakin besar. Pertumbuhan ini disebabkan oleh sekresi estrogen oleh folikel itu sendiri semakin bertambah sehingga sel granulosa membentuk reseptor FSH semakin banyak. Folikel yang memiliki sel granulosa lebih banyak akan lebih sensitif terhadap FSH sehingga folikel akan semakin berkembang. FSH dan estrogen secara bersama-sama akan memicu reseptor LH di sel granulosa. LH yang berikatan dengan reseptornya akan memicu sekresi folikel sehingga bertambah besar. Peningkatan kadar estrogen dan LH bersama-

sama menyebabkan proliferasi sel teka folikel dan meningkatkan sekresinya, sehingga ukuran folikel akan semakin besar dan massanya juga bertambah (Guyton dan Hall, 1997; Sperof dan Frits, 2005).

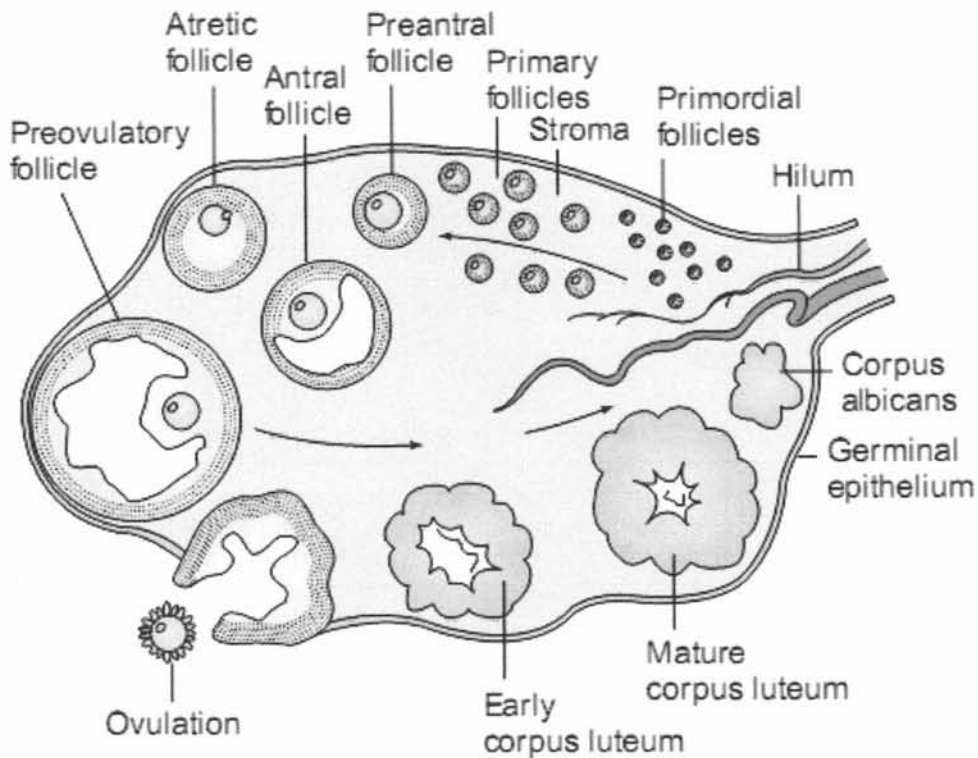
Satu folikel tumbuh lebih besar dibandingkan dengan folikel yang lain sebelum ovulasi, sedangkan folikel lain yang tidak tumbuh akan mengalami atresia. Hal ini disebabkan oleh folikel yang mensekresi estrogen lebih banyak akan membuat reseptor FSH yang lebih banyak, sehingga lebih sensitif terhadap FSH dan semakin bertambah besar membentuk folikel dominan. Folikel yang mensekresi estrogen lebih sedikit akan membentuk sedikit reseptor FSH sehingga kurang sensitif terhadap FSH, akibatnya tidak bisa berkembang dan menjadi atresia. Folikel dominan ini disebut sebagai folikel yang matang dan siap untuk berovulasi (Guyton dan Hall, 1997; Sperof dan Frits, 2005).

Mekanisme lain terbentuknya folikel atresia adalah proses keseimbangan proapoptosis dan anti-apoptosis yang sama-sama diperankan oleh protein famili BCL2. Proapoptosis diperankan oleh Bax, sedangkan antiapoptosis diperankan oleh BCL2. Proapoptosis yang dominan akan menyebabkan folikel menjadi atresia. Folikel atresia diinduksi oleh keluarnya androgen. Androgen menginduksi keluarnya protein Bax yang mempengaruhi permeabilitas membran mitokondria sehingga salurannya terbuka dan mengeluarkan sitokrom-C yang akan mengaktifkan AIF. AIF inilah yang akan mengaktifkan caspase 3, 8 dan 9 sehingga terjadi apoptosis (Valdez dkk., 2005; Saatli dkk., 2009). Apoptosis yang terjadi akan menyebabkan jumlah sel granulosis akan berkurang dan menjadi atresia sehingga folikel juga tidak dapat berkembang (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Perkembangan dan atresia folikel pada ovarium mamalia (Matsuda-Minehata dkk., 2006)

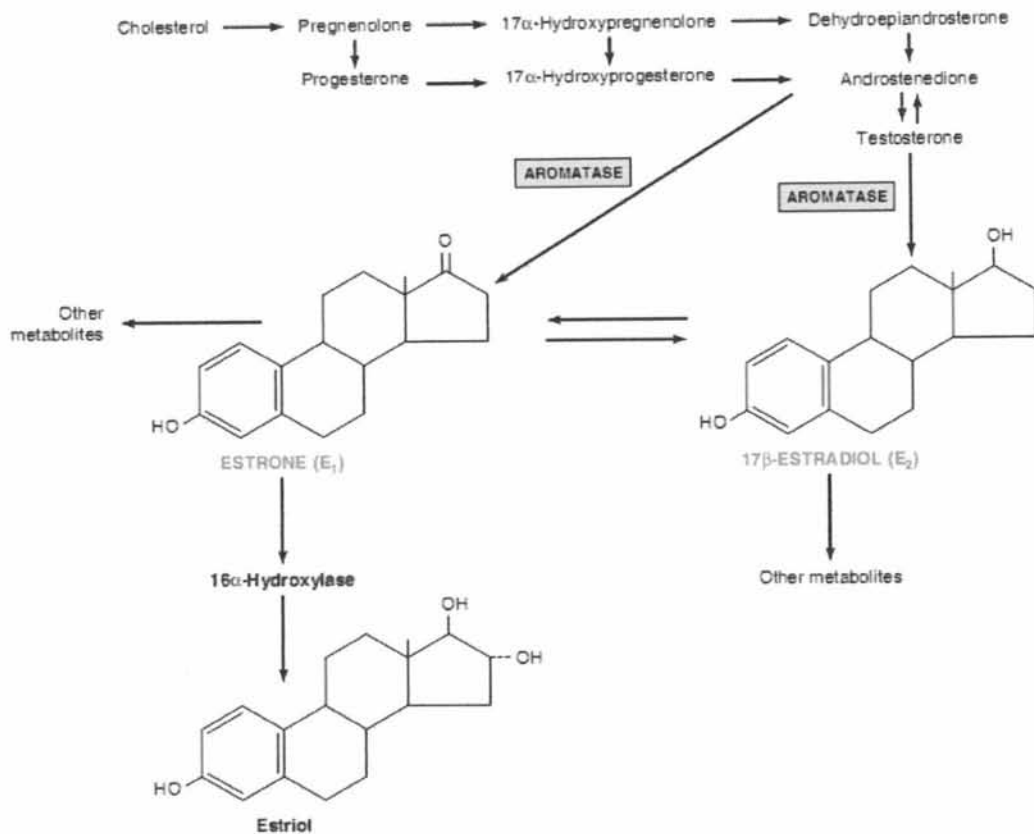
Folikel akan kolaps setelah ovulasi, memasuki fase luteal dan siklus menstruasi dimulai. Sel granulosa yang tersisa akan membentuk korpus luteum karena berwarna kekuningan. Oosit yang tidak dibuahi atau tidak terjadi fertilisasi akan menyebabkan korpus luteum menjadi korpus albicans yang berwarna putih (Gambar 2.7) (Mehring, 2003).



Gambar 2.7 Awal pertumbuhan dan rupturnya folikel ovarium (Mehring, 2003)

2.3 Hormon Estrogen

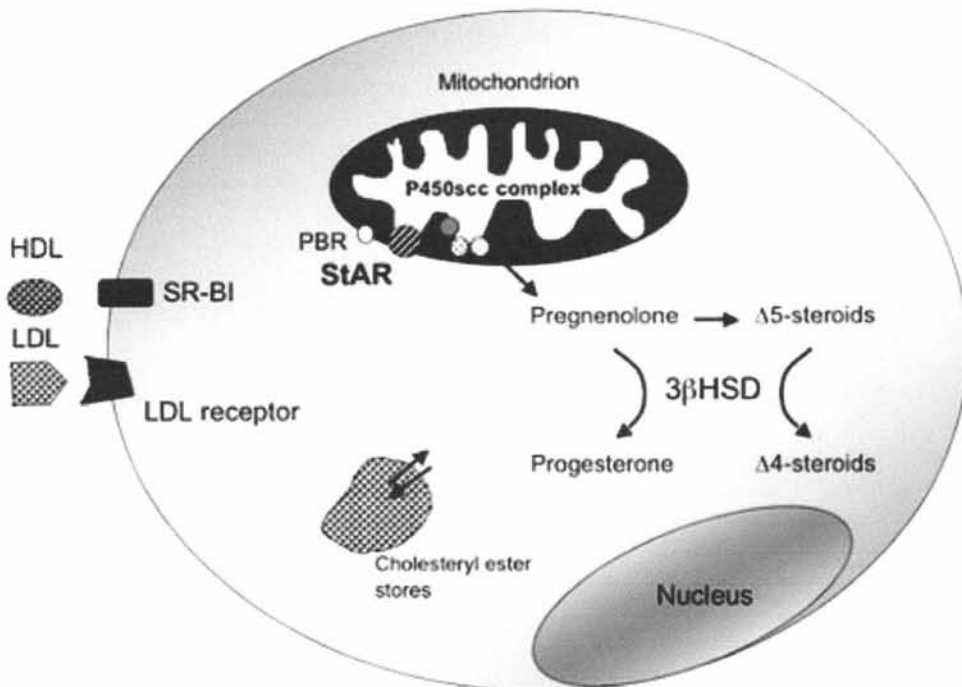
Semua hormon steroid memiliki struktur dasar yang sama, yaitu molekul perhidrosiklopentanafenantren. Molekul tersebut terdiri dari 3 cincin 6 karbon dan 1 cincin 5 karbon. Satu cincin adalah benzen, 2 cincin naftalen, dan 3 cincin fenantren, kemudian ditambah dengan 1 siklopentana (cincin 5 karbon). Estrogen adalah hormon steroid yang memiliki 18 karbon (Sperof dan Frits, 2005). Sintesis estrogen berasal dari kolesterol seperti pada Gambar 2.8



Gambar 2.8 Biosintesis estrogen (Granner, 2003)

Sintesis hormon steroid seks terjadi di dalam sel steroidogenik, yaitu sel teka, sel granulosa yang mengalami lutealisasi, sel luteal dan sel Leydig. Lokasi lain untuk steroidogenesis adalah plasenta, korteks adrenal dan otak. Protein pengangkut bahan baku steroidogenesis terdapat di dalam sel tersebut. Kolesterol dalam bentuk HDL kolesterol dan LDL kolesterol sebagai bahan baku steroidogenesis akan berikatan dengan reseptornya di sel teka, kemudian diangkut ke dalam mitokondria dengan bantuan protein fosfoprotein sitoplasmik yang disebut StAR. Kolesterol masuk dari membran luar mitokondria ke dalam membran dalam mitokondria dipengaruhi oleh 2 faktor, yaitu ekspresi StAR dan interaksi StAR dengan membran mitokondria. StAR bekerja di sitoplasma dari membran mitokondria bagian luar dengan membuka konformasinya untuk

memasukkan kolesterol ke dalam mitokondria. Enzim sitokrom P450scc akan mengubah kolesterol menjadi pregnenolon di membran dalam mitokondria. Pregnenolon yang dikeluarkan dari mitokondria akan diubah menjadi progesteron dengan bantuan enzim 3β HSD (Gambar 2.9) (Bose dkk., 2007; King dan Lavoie, 2009).

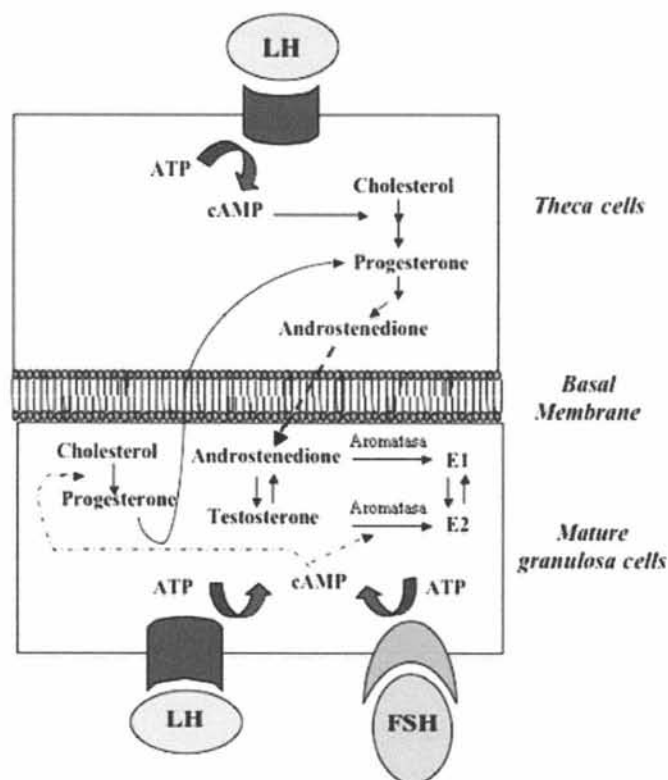


Gambar 2.9 Tahapan steroidogenesis dan sintesis progesteron (King dan Lavoie, 2009)

Steroidogenesis di ovarium dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan dan gonadotropin. Produksi steroid seks yang meningkat dapat disebabkan oleh peningkatan transkripsi enzim steroidogenik dan StAR (King dan Lavoie, 2009). Enzim yang terkait dalam proses steroidogenesis seperti pada Gambar 2.10.

fase ini terjadi sintesis progesteron di dalam sel granulosis melalui reaksi kolesterol yang diubah dahulu menjadi pregnenolon dengan bantuan LH, kemudian pregnenolon akan diubah menjadi progesteron (Gant dan Cunningham, 1993; Cunningham dkk., 1995).

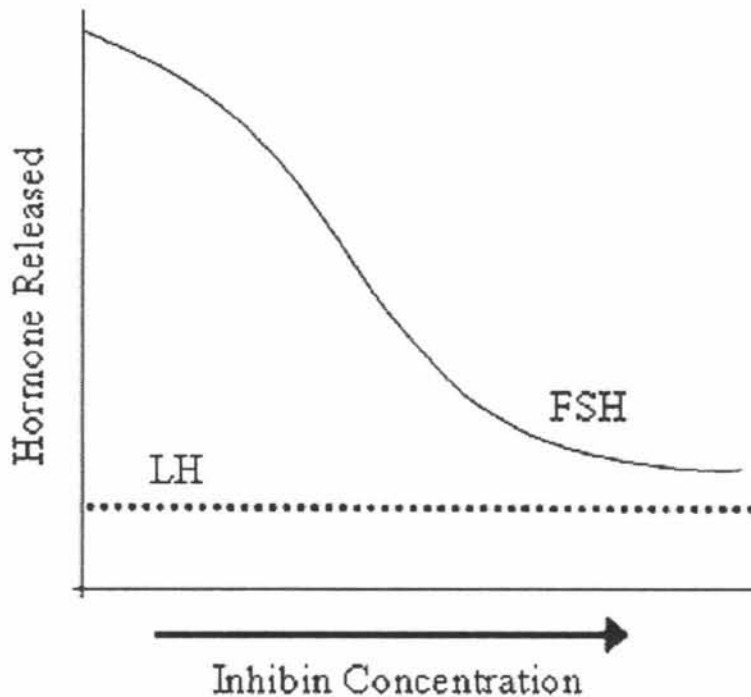
Reseptor LH di dalam folikel preantral dan antral hanya ada di sel teka, sedangkan reseptor FSH hanya ada di sel granulosis. Sel intersisial teka di lapisan teka interna memiliki 20.000 reseptor LH di membran selnya. Sel teka yang dipengaruhi oleh LH akan memproduksi androgen. Androgen yang diaromatisasi menjadi estrogen di sel granulosis dengan bantuan FSH. Interaksi antara sel teka dan granulosis menghasilkan peningkatan produksi estrogen. Produksi estrogen akan maksimal pada perkembangan folikel antral. Konversi androgen menjadi estrogen tergantung sensitifitas sel terhadap FSH. Proses tersebut merupakan konsep 2 sel 2 gonadotropin seperti pada Gambar 2.11 (Speroff dan Fritz, 2005).



Gambar 2.11 Konsep 2 sel dan 2 gonadotropin (Tesone dkk., 2009)

Mekanisme umpan balik tidak hanya diperankan oleh gonadotropin dan hormon steroid seks ovarium, tapi juga peptida lain yang disintesis oleh sel granulosis, yaitu inhibin, aktivin dan folistatin. Sekresi ketiga peptida tersebut terjadi akibat respon sel granulosis terhadap FSH. Peptida tersebut disekresi ke cairan folikel dan vena ovarika, ekspresinya terdapat di banyak jaringan tubuh sebagai regulator autokrin-parakrin (Sperof dan Frits, 2005).

FSH menstimulasi sekresi inhibin di sel granulosis, tapi fungsi FSH sendiri akan ditekan oleh inhibin (Gambar 2.12). Aktivin juga berasal dari sel granulosis, tapi juga terdapat di pituitari. Aktivin meningkatkan respon pituitari terhadap GnRH dengan meningkatkan jumlah reseptor GnRH, sehingga akan menstimulasi keluarnya FSH di pituitari. Folistatin yang berikatan dengan aktivin berfungsi untuk menekan aktivitas FSH.



Gambar 2.12 Efek inhibin terhadap produksi FSH (Campo dkk., 2009)

Estrogen yang disekresikan terdiri dari beta estradiol (E2), estron (E1) dan estriol (E3). Perbandingan potensi estrogenik dari ketiga estrogen tersebut adalah $E2 : E1 : E3 = 10 : 5 : 1$. Estrogen utama yang disekresi adalah beta estradiol karena efek estrogeniknya 12 kali lebih besar daripada estron dan 80x lebih besar daripada estriol. Estron disekresi dalam jumlah kecil dari aromatisasi androgen di perifer. Estriol adalah bentuk oksidasi estradiol dan estron, perubahannya terjadi di hepar (Guyton dan Hall, 1997; Wiknjosastro, 1997).

Estradiol diproduksi oleh ovarium sebesar 100-300 mg/hari pada wanita normal yang tidak hamil, androstenedion diproduksi 3 mg/hari dan sebesar 1% dari androstenedion yang diproduksi akan diaromatisasi di sirkulasi perifer menjadi estron. Estrogen total lebih digambarkan oleh produksi ovarium karena hasil konversi di perifer sangat kecil (Sperof dan Frits, 2005).

Estrogen berfungsi untuk karakteristik seksual sekunder wanita, perkembangan organ genitalia interna dan eksterna, glandula mammae, rongga pelvis, distribusi lemak di bawah kulit, kontur tubuh wanita, pertumbuhan tulang dan penutupan epifisis tulang panjang serta sistem muskuloskeletal lainnya (kartilago, tendon, dan ligametum). Estrogen akan bekerjasama dengan hormon lain dalam proses ovulasi, implantasi, kehamilan, persalinan dan laktasi (Mehring, 2003; Rushton, 2004; Yahya, 2003).

2.4 Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) adalah hewan poliestrus, yaitu mengalami beberapa siklus birahi dalam 1 tahun kecuali saat bunting. Satu siklus birahi terdiri dari 4 fase, yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Fox dan Laird, 1970). Fase

proestrus merupakan fase persiapan sebelum memasuki fase estrus hingga diestrus. Fase proestrus terjadi selama 12 jam, terjadi pertumbuhan folikel akibat pengaruh FSH. Folikel mengandung cairan yang dinamakan estradiol. Efek dari estradiol ini adalah meningkatkan sirkulasi darah ke alat kelamin sehingga vulva membengkak, vestibulum menjadi kemerahan, sel mukosa vagina udem dan terdapat sekret dari servik (Salisbury dan VanDemark, 1984; Fox dan Laird, 1970).

Manifestasi birahi secara fisik akan terlihat pada fase estrus (fase kawin), mulai mempersiapkan diri untuk kopulasi. Perkembangan folikel pada fase estrus akan semakin cepat dan mulai terjadi peningkatan LH. LH yang tinggi akan membantu ovulasi di akhir fase estrus dan pembentukan korpus luteum. Fase estrus berlangsung 9-15 jam, rata-rata selama 12 jam. Fase ini juga disertai dengan perubahan perilaku seperti berlari, menggerakkan telinga, badan akan lordosis jika bertemu dengan mencit lainnya. Birahi akan berhenti pada fase metestrus. Folikel akan pecah dan mengeluarkan ovum, kemudian rongga folikel mengecil, pada fase ini tidak terjadi pengeluaran sekret. Epitel vagina akan melepaskan sebagian besar sel baru yang terbentuk. Fase metestrus berlangsung selama 20 jam (Salisbury dan VanDemark, 1984; Fox dan Laird, 1970 Kusumawati, 2004).

Fase yang terakhir adalah diestrus, dimana korpus luteum telah terbentuk sempurna. Hormon yang dihasilkan pada fase ini adalah progesteron yang akan membuat endometrium menebal, kelenjar dan otot uterus berkembang. Kondisi ini merupakan persiapan untuk terjadinya kebuntingan. Ovum yang berhasil dibuahi akan menyebabkan korpus luteum bertahan selama kebuntingan. Ovum

yang tidak berhasil dibuahi akan menyebabkan korpus luteum berdegenerasi dan mempersiapkan siklus selanjutnya. Fase diestrus berlangsung selama 57-60 jam (Salisbury dan VanDemark, 1984; Kusumawati, 2004). Data biologi mencit seperti pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Data biologi mencit (*Mus musculus*) (Kusumawati, 2004; Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)

DATA BIOLOGI	KETERANGAN
Berat badan jantan (g)	20-40
Berat badan betina (g)	18-35
Lama hidup (tahun)	1-2, dapat mencapai 3 tahun
Temperatur tubuh (°C)	36,5
Kebutuhan air (ml/100 g BB)	Ad libitum
Kebutuhan makanan (g/100 g BB)	4-5
Pubertas (hari)	28-49
Umur dewasa (hari)	35
Perkawinan	Pada saat estrus
Lama kebuntingan (hari)	19-20
Tipe siklus estrus	Poliestrus
Kawin setelah beranak	1-24 jam
Lama siklus estrus (hari)	4-5
Estrus (jam)	9-20
Metestrus (jam)	20
Diestrus (jam)	57-60
Proestrus (jam)	12
Mekanisme ovulasi	Spontan
Ovulasi	Akhir estrus
Jumlah anak (ekor)	4-8
Berat anak lahir (g)	0,5-1
Umur sapih (hari)	18-21
Berat anak sapih (g)	10-12

2.5 Efek Nikotin Terhadap Folikulogenesis dan Kadar Estrogen

Rokok dapat menyebabkan kondisi pro-oksidan di dalam folikel de Graaf. Pro-oksidan terbanyak yang terkandung dalam rokok adalah nikotin. Pro-oksidan ini dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid di dalam folikel ovarium yang disertai dengan terganggunya antioksidan lokal secara enzimatik maupun non enzimatik. Wanita yang terpajan rokok akan ditemukan adanya kotinin (salah

satu hasil metabolit nikotin) di dalam cairan folikel pada fase pre-ovulasi (Paszkowski dkk., 2002; Appasamy dkk., 2008). Nikotin dapat masuk ke dalam cairan folikel melalui proses difusi dari pembuluh darah karena barier darah-folikel permeabel terhadap nikotin (Fabro, 1978).

Antioksidan yang penting selama folikulogenesis seperti katalase, SOD, GSH transferase, paraoxanase, *heat shock protein 27*, dan protein isomerase akan melindungi oosit melawan trauma dari luar seperti stres oksidatif. Keseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan akan mempertahankan kondisi folikulogenesis berlangsung normal. Ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan yaitu pro-oksidan lebih banyak dari antioksidan, atau terjadi gangguan pada antioksidan maka akan menimbulkan stres oksidatif (Agarwal dkk., 2008).

Stres oksidatif yang terjadi akan menyebabkan proses peroksidasi lipid sehingga merusak sel granulosa dan dapat menekan sintesis hormon di ovarium. Salah satu prediktor respon ovarium akibat kerusakan yang terjadi adalah pengukuran kadar estrogen. Kadar estrogen yang tinggi menunjukkan respon ovarium masih baik, sedangkan jika kadarnya sudah rendah maka menggambarkan respon dan fungsi yang sudah menurun (Paszkowski dkk., 2002; Appasamy dkk., 2008).

Nikotin akan menghambat pembelahan sel endotelial dan dapat menginduksi matinya sel tersebut dengan dosis pajanan yang tinggi. Kondisi ini menyebabkan revaskularisasi folikel ovarium tidak terjadi sehingga dengan vaskularisasi yang rendah maka perkembangannya akan terhambat (Bordel dkk., 2006).

Efek lain dari nikotin yang juga dapat menghambat perkembangan folikel adalah dengan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel granulosa. Apoptosis

adalah proses yang bisa terjadi dalam folikulogenesis normal yang akan menghasilkan folikel atresia, degenarasi dan jumlah yang berkurang. Keseimbangan antara pro-apoptotik dan anti-apoptotik terjadi pada kondisi normal. Proses apoptotik diinduksi oleh nikotin yang bersifat oksidan, maka stres oksidatif yang terjadi dapat mempengaruhi Bax untuk mengubah permeabilitas mitokondria sehingga keluar sitokrom-C untuk mengaktifkan AIF. AIF akan mengaktifkan caspase 3, 8 dan 9 untuk menimbulkan apoptosis. Apoptosis menyebabkan ukuran folikel menjadi lebih kecil dan atresia sehingga terjadi regresi dalam proses folikulogenesis. Sel granulosis yang mengalami apoptosis akan terganggu fungsinya, sehingga aromatisasi estrogen yang berlangsung di sana juga terganggu. Dampaknya adalah sintesis estrogen menjadi lebih rendah dari kondisi normal (Agarwal dkk., 2008; Acosta dkk., 2009; Saatli dkk., 2009).

Sintesis estrogen juga dapat terganggu akibat efek nikotin secara seluler di mitokondria. Sintesis estrogen berawal dari kolesterol sebagai bahan baku steroidogenesis di mitokondria sel teka. Prosesnya berjalan dengan bantuan ekspresi StAR dan interaksi StAR dengan membran mitokondria untuk memasukkan bahan baku sintesis estrogen yaitu kolesterol. Nikotin secara langsung dapat memblokir masuknya kolesterol dengan menghambatnya masuknya StAR untuk membantu memasukkan kolesterol dari membran luar mitokondria ke dalam membran dalam mitokondria, dan menghambat interaksi StAR dengan membran mitokondria saat memasukkan kolesterol sehingga tidak ada bahan baku yang masuk ke dalam mitokondria untuk sintesis estrogen. Nikotin menyebabkan StAR tidak dapat membuka konformasi membran luar mitokondria sehingga kolesterol tidak bisa masuk. Bahan baku yang sedikit ini menyebabkan sintesis

pregnenolon berkurang, sehingga kadar estrogen juga menjadi rendah (Bose dkk., 2007).

Salah satu hasil metabolit nikotin juga dapat mempengaruhi steroidogenesis, yaitu M-nikotin. Hasil metabolit ini mempengaruhi steroidogenesis di sel luteal sehingga produksi progesteron terganggu. Progesteron akan terus mengalami metabolisme hingga menjadi estrogen seperti terlihat pada gambar 2.5, sehingga hasil akhirnya kadar estrogen juga akan berkurang (Miceli dkk., 2005).

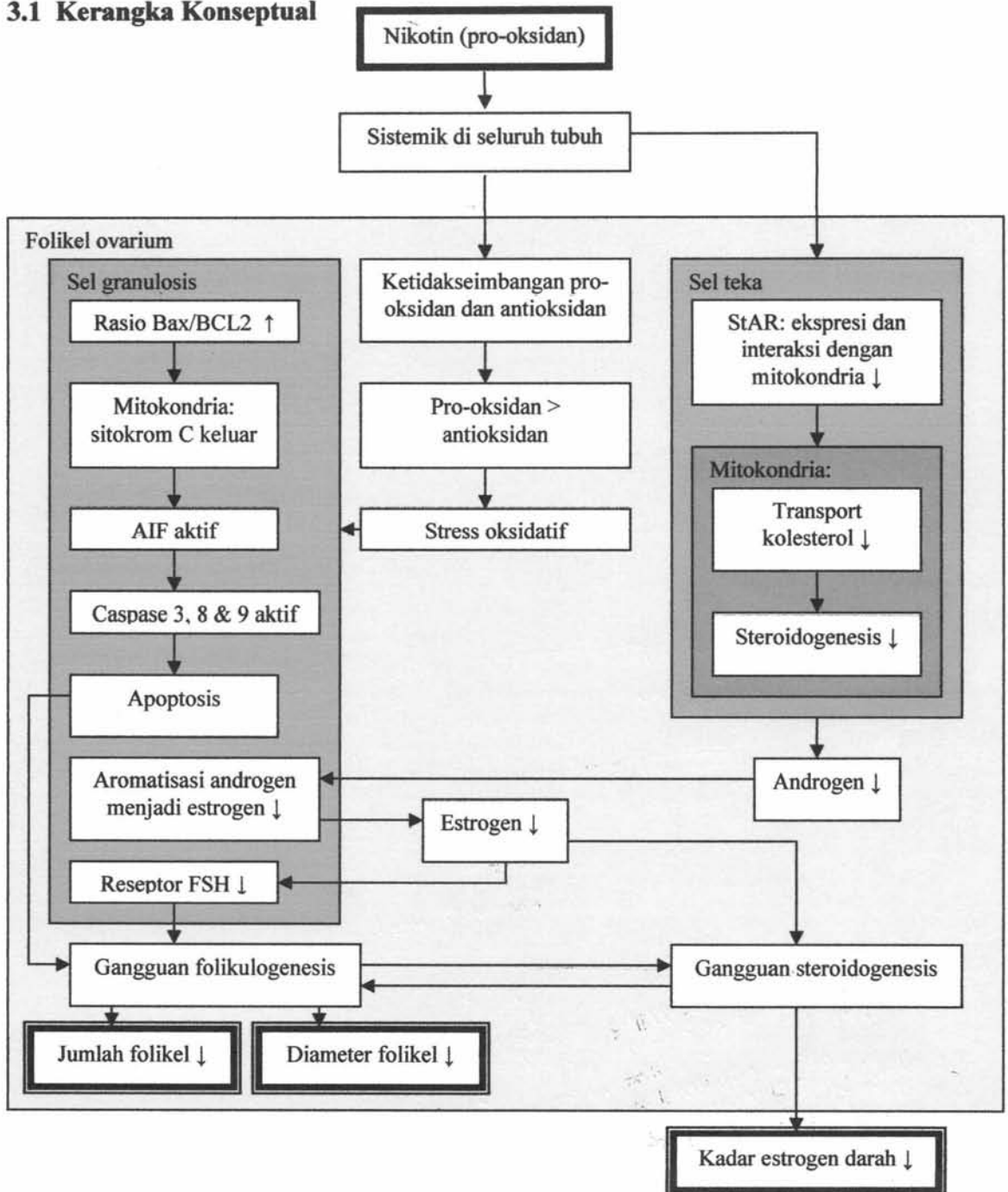
Akibat dari seluruh proses tersebut adalah gangguan fungsi proliferaatif ovarium (folikulogenesis) dan gangguan steroidogenesis oleh ovarium (sintesis hormon estrogen). Gangguan tersebut dapat menyebabkan amenore, perdarahan uterus disfungsi dan hirsutism yang merupakan masalah infertilitas yang banyak terjadi di masyarakat (ESHRE, 2002; Wiknjastro, 1997).

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL DAN
HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan Gambar:
 → Mengakibatkan
 □ Tidak diteliti

▭ Perlakuan
 ▭ Variabel yang diukur

Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk menunjukkan bahwa rokok dapat menurunkan fertilitas wanita dengan berbagai mekanisme. Salah satu mekanismenya adalah melalui proses stres oksidatif. Nikotin merupakan kandungan rokok terbanyak dan sumber utama pro-oksidan pada rokok. Paparan nikotin menyebabkan ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan di dalam tubuh termasuk folikel ovarium sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga dapat merusak sel (Paszkowski dkk., 2002).

Stres oksidatif akibat paparan nikotin akan menyebabkan apoptosis pada sel granulosa dari folikel di ovarium dengan meningkatkan rasio Bax/BCL2. Tingginya jumlah Bax menyebabkan permeabilitas mitokondria terganggu sehingga sitokrom-C keluar dan mengaktifkan AIF. AIF akan mengaktifkan caspase 3, 8, dan 9 untuk menimbulkan apoptosis. Apoptosis tersebut akan menyebabkan folikel menjadi atresia, degeneratif dan jumlahnya berkurang (Bordel dkk., 2005; Agarwal dkk., 2008). Gangguan pertumbuhan folikel digambarkan melalui gangguan pertumbuhan folikel primordial menjadi folikel antral dan mengecilnya diameter folikel (Neil dkk., 2007).

Gangguan follikulogenesis yang digambarkan dengan sedikitnya jumlah folikel dan kecilnya diameter folikel akan mengganggu steroidogenesis yang mengakibatkan pembentukan hormon steroid seks terganggu. Indikator yang digunakan untuk mengetahui kerusakan ovarium adalah pengukuran kadar estrogen (Paszkowski dkk., 2002). Kadar estrogen yang rendah hanya akan membentuk reseptor FSH yang sedikit di dalam folikel sehingga tidak dapat

membentuk folikel dominan, dengan demikian folikulogenesis juga akan terhambat (Guyton dan Hall, 1997; Speroff dan Frits, 2005).

Nikotin juga dapat menghambat sintesis estrogen di mitokondria sel teka dengan mengganggu fungsi StAR. StAR dalam keadaan normal berfungsi membantu transpor kolesterol ke dalam mitokondria untuk dijadikan sebagai bahan baku sintesis estrogen. Fungsi StAR yang terganggu akibat pajanan nikotin menyebabkan ekspresi StAR dan interaksi StAR dengan mitokondria juga terganggu. Kadar estrogen yang dihasilkan dalam steroidogenesis akhirnya akan lebih rendah karena bahan bakunya telah berkurang (Bose dkk., 2007). Gangguan folikulogenesis dan sintesis estrogen akibat pajanan nikotin merupakan gambaran kerusakan ovarium yang dapat menyebabkan infertilitas.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian yang dibuat berdasarkan latar belakang permasalahan, tujuan penelitian, tinjauan kepustakaan dan kerangka konsep adalah:

1. Jumlah folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih sedikit daripada kontrol.
2. Diameter folikel pada proses folikulogenesis mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih kecil daripada kontrol.
3. Kadar estrogen darah mencit yang terpajan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB lebih rendah daripada kontrol.
4. Terdapat korelasi antara jumlah folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit.

5. Terdapat korelasi antara diameter folikel pada proses folikulogenesis akibat paparan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB dengan kadar estrogen darah mencit.

BAB IV
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

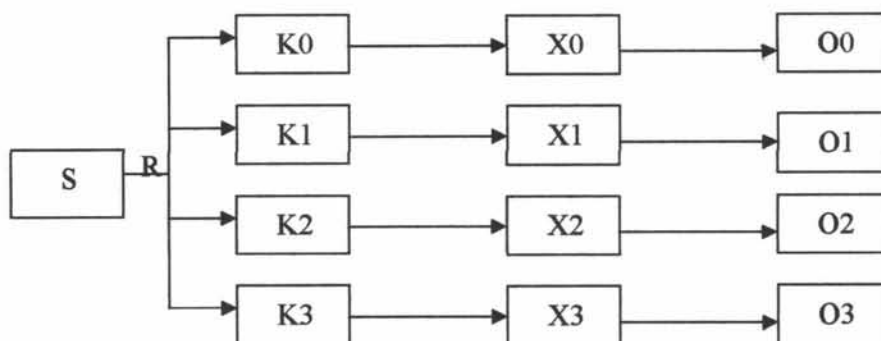
MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini bersifat eksperimental karena memberikan perlakuan terhadap mencit (*Mus musculus*) berupa injeksi nikotin subkutan dengan berbagai dosis dan hasilnya akan dibandingkan dengan kontrol. Jenis rancangannya adalah *post test only control group design* (Tjokroprawiro dkk., 1996; Sugiyono, 2008; Budiarto, 2003). Subjek penelitian terdiri dari 4 kelompok yang dipilih secara acak dan telah dihomogenkan. Satu kelompok sebagai kontrol dan 3 kelompok lainnya sebagai kelompok perlakuan yang diberikan nikotin dengan dosis yang berbeda.

Penelitian ini menggunakan mencit karena secara etik tidak dapat memberikan perlakuan pajanan nikotin terhadap manusia. Mencit merupakan spesies ideal untuk uji toksikologi. Mencit adalah hewan coba yang sesuai untuk uji toksisitas yang memerlukan jumlah sampel yang banyak. Mencit memiliki siklus reproduksi yang pendek yaitu 4-5 hari sehingga pengamatan dapat lebih singkat. Mencit mudah dipegang dan dikendalikan sehingga pemberian materi perlakuan mudah diberikan. Volume darah maksimal yang dapat diambil dari mencit adalah 7,7 ml/kg BB. Pemeliharaan mencit relatif mudah dan murah sehingga sebanyak 60-80% penelitian medis menggunakan mencit (Kusumawati, 2004). Dosis yang digunakan untuk penelitian ini adalah berdasarkan penelitian Kakisina (2003) yaitu 3, 6 dan 12 mg/kgBB.

Skema dari rancangan penelitian ini adalah:



Gambar 4.1 Rancangan penelitian (Sugiyono, 2008; Tjokoprawiro dkk., 1996)

Keterangan:

S : sampel

R : random

K0 : kelompok kontrol

K1-K3 : kelompok perlakuan (diberikan nikotin dengan berbagai dosis)

X0 : tanpa perlakuan (diberikan akuabidestilata subkutan)

X1 : perlakuan 1 (diberikan nikotin 3 mg/kgBB subkutan)

X2 : perlakuan 2 (diberikan nikotin 6 mg/kgBB subkutan)

X3 : perlakuan 3 (diberikan nikotin 12 mg/kgBB subkutan)

O0-O3 : pengamatan jumlah dan diameter folikel ovarium dan kadar estrogen darah mencit

4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Populasi penelitian ini adalah mencit betina dewasa dengan spesies *Mus musculus* galur Balb/C. Kriteria sampel yang digunakan adalah sehat dan tidak bunting, fertil (sudah pernah beranak), umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram, morfologi mencit terlihat sehat (bergerak lincah tidak lesu, kulit bersih tanpa luka, mata terang dan tidak layu), diperoleh dari lokasi yang sama dengan harapan mencit yang digunakan berasal dari keturunan yang sama.

Besar sampel minimal yang digunakan berdasarkan rumus replikasi oleh Kemas (1991), yaitu:

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

$$(3-1)(r-1) \geq 15$$

$$2(r-1) \geq 15$$

$$2r - 2 \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$2r \geq 17; r \geq 8,5$$

Keterangan:

t = jumlah *treatment*/perlakuan

r = jumlah replikasi (jumlah sampel tiap kelompok)

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan hasil perhitungan di atas adalah 9 ekor. Sampel akan ditambahkan minimal sebesar 20% (2 ekor) tiap kelompok untuk menghindari kematian dan hal lain yang tidak diinginkan sehingga menjadi 11 ekor tiap kelompok. Pemilihan sampel secara acak dilakukan dengan menandai semua mencit dengan angka 1 hingga 44 sesuai jumlah total mencit, kemudian secara acak memilih 11 nomor pertama untuk kelompok kontrol, 11 nomor kedua untuk kelompok 1, dan seterusnya hingga terdapat 4 pembagian kelompok mencit. Mencit yang dimasukkan pada kelompok disesuaikan dengan nomor yang sudah diacak tadi (Gambar 4.2)



Gambar 4.2 Pengelompokan mencit berdasarkan kelompok perlakuan

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

Variabel pada penelitian ini adalah variabel bebas, tergantung dan kendali. Variabel bebas (*independent variable*) adalah nikotin dengan dosis 3 mg/kgBB, 6 mg/kgBB, dan 12 mg/kgBB. Variabel tergantung (*dependent variable*) meliputi jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan folikel de Graaf, diameter folikel primer, sekunder, tersier dan folikel de Graaf serta kadar estrogen darah. Variabel kendali pada penelitian ini antara lain jenis, umur, kesehatan fisik, jenis makanan, perawatan dan pemeliharaan sanitasi hewan coba, pembuatan preparat histologis dan pengukuran kadar estrogen darah.

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel

NO	VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	CARA PERHITUNGAN	HASIL PERHITUNGAN	SKALA DATA
1.	Nikotin	Larutan alkaloid dengan rumus kimia $C_{10}H_{14}N_2$, tidak berwarna. Larutan murni dengan konsentrasi 97% akan diencerkan dengan akuabidest sebelum diberikan pada mencit	3 mg/kgBB 6 mg/kgBB 12 mg/kgBB	Mg	Rasio
2.	Jumlah folikel primer	Banyaknya folikel yang ditandai dengan oosit yang dikelilingi oleh selapis sel epitel kuboid, ditemukan adanya zona pelusida di bawah lapisan folikel.	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya	Rerata jumlah folikel primer dari kedua ovarium tiap mencit.	Rasio
3.	Jumlah folikel sekunder / preantral	Banyaknya folikel yang ditandai dengan oosit yang dikelilingi oleh 2-3 lapis sel epitel kuboid (stratum granulosum).	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya	Rerata jumlah folikel sekunder/preantral dari kedua ovarium tiap mencit.	Rasio
4.	Jumlah folikel tersier/antral	Banyaknya folikel yang ditandai dengan stratum granulosum yang lebih besar daripada folikel sekunder, terdapat antrum yang berisi cairan. Folikel ini dilingkupi oleh teka interna dan eksterna.	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya	Rerata jumlah folikel tersier/antral dari kedua ovarium tiap mencit.	Rasio

5.	Jumlah folikel de Graaf	Banyaknya folikel yang ditandai dengan oosit yang dikelilingi oleh beberapa lapis sel epitel dalam kumulus ooforus, disebut korona radiata. Antrum lebih luas daripada folikel tersier dan berisi cairan folikuli.	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya	Rerata jumlah folikel de Graaf dari kedua ovarium tiap mencit, ketelitian 2 angka desimal.	Rasio
6.	Diameter folikel primer	Panjang dari garis tengah folikel primer	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya. Pengukuran menggunakan mikrometer	Rerata diameter folikel primer dari kedua ovarium tiap mencit, ketelitian 2 angka desimal.	Rasio
7.	Diameter folikel sekunder	Panjang dari garis tengah folikel sekunder	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya. Pengukuran menggunakan mikrometer	Rerata diameter folikel sekunder dari kedua ovarium tiap mencit, ketelitian 2 angka desimal.	Rasio
8.	Diameter folikel tersier	Panjang dari garis tengah folikel tersier	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya. Pengukuran menggunakan mikrometer	Rerata diameter folikel tersier dari kedua ovarium tiap mencit, ketelitian 2 angka desimal.	Rasio

9.	Diameter folikel de Graaf	Panjang dari garis tengah folikel de Graaf	Perhitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang tiap preparat pada pembesaran 100x dengan mikroskop cahaya. Pengukuran menggunakan mikrometer	Rerata diameter folikel de Graaf dari kedua ovarium tiap mencit, ketelitian 2 angka desimal.	Rasio
10.	Kadar estrogen darah	Jumlah hormon estrogen yang ada di sirkulasi darah	Pengukuran melalui metode Elisa	Perhitungan berdasarkan grafik standar Elisa	Rasio

4.4 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah larutan nikotin dengan kemurnian 97% yang diproduksi oleh Wako Pure Chemical Industries, Ltd Jepang (Gambar 4.3), minuman yang diberikan adalah air PDAM ad libitum, makanan berupa BR 1 CP 511 sebanyak 4-5 g/100 g BB/ekor yang diproduksi oleh PT. Charoen Pokphand Indonesia dengan rincian nutrisi standar mencit seperti pada Tabel 4.2, NaCl fisiologis untuk memeriksa siklus birahi mencit, sekam untuk alas tidur yang diganti tiap 2 hari, larutan Boin, etanol 70%, larutan Carmin (pewarna), bahan untuk pembuatan preparat histopatologi ovarium (zat warna giemsa 10%, metanol, NaCl fisiologis 0,9%, larutan formalin 10%, alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan alkohol absolut, xylol, parafin, *Canada Balsem*, dan pewarnaan HE) dan bahan-bahan untuk pemeriksaan Elisa (estradiol standar dari serum manusia dengan kadar 0, 10, 30, 100, 300 dan 1000 pg/ml, reagen anti estradiol dari kelinci dalam medium BSA, reagen estradiol-HRP terkonjugasi, reagen TMB, *deionized water* dan *stop solution* yang mengandung HCl 1N)

Tabel 4.2 Nutrisi standar mencit (Kusumawati, 2004)

JENIS NUTRISI	KEBUTUHAN NUTRISI (%)
Protein	20-25
Lemak	5-12
Serat kasar	2,5
Karbohidrat	45-60

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang kotak plastik tertutup kawat sebanyak 8 buah dilengkapi tempat makan dan botol minuman (kandang dibersihkan tiap hari, suhu disesuaikan dengan suhu ruangan, ventilasi dan sinar matahari yang cukup dan tidak lembab), potongan kertas untuk alas kandang, *cotton bud* untuk melakukan apusan mukosa vagina, *syringe* injeksi 1 ml, kaca objek dan penutupnya, mikrotom, mikroskop cahaya, mikrometer, alat bedah dan papan diseksi, timbangan untuk mengukur berat badan mencit, fotografi dan film dan peralatan untuk Elisa (mikrotiter yang dindingnya dilapisi anti IgG, mikropipet, vortex, kertas absorben, dankertas grafik untuk pembacaan kadar estrgen).

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Pebruari-April 2010. Pemeliharaan mencit dan pemeriksaan apusan vagina dilakukan di Laboratorium *Invitro* FKH Unair Surabaya. Pemeriksaan folikulogenesis ovarium mencit dilakukan di Laboratorium Biologi FSAINTEK Unair Surabaya. Pemeriksaan kadar estrogen darah mencit dilakukan di Laboratorium Kebidanan FKH Unair Surabaya.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Larutan Nikotin

Dosis nikotin yang digunakan adalah 3 mg/kgBB, 6 mg/kgBB dan 12 mg/kgBB. Dosis tersebut kemudian disesuaikan dengan berat badan mencit yang digunakan. Nikotin cair dengan kemurnian 97% dilarutkan dengan akuabidestilata (Gambar 4.3), kemudian diberikan sesuai dosis yang telah dihitung untuk tiap mencit. Cara melarutkan nikotin murni seperti pada Lampiran 1.



Gambar 4.3. Larutan nikotin yang sudah diencerkan

4.7.2 Cara Perlakuan dan Pengamatan

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini sesuai pada kerangka operasional (Gambar 4.8), yaitu diawali dengan persiapan hewan coba. Seluruh mencit ditimbang sebelum digunakan sebagai subjek penelitian dan dilakukan adaptasi terlebih dahulu di kandang percobaan Laboratorium *Invitro* FKH Unair selama tujuh hari. Seluruh mencit kemudian diperiksa apusan vagina untuk mengetahui fase yang sedang berlangsung, kemudian dibagi menjadi empat kelompok secara

acak, masing-masing kelompok terdiri dari 11 ekor mencit yang diletakkan dalam kandang.

Tahap perlakuan dilaksanakan setelah tahap persiapan selesai, yaitu mencit disuntikkan nikotin 3 mg/kgBB (Kelompok 1), 6 mg/kgBB (Kelompok 2) dan 12 mg/kgBB (Kelompok 3) secara subkutan sekali sehari selama 7 hari. Kelompok kontrol hanya disuntikkan akuabidest dengan cara dan lama perlakuan yang sama dengan kelompok perlakuan. Lokasi penyuntikan disemprot dengan larutan alkohol 70% sebelum dilakukan penyuntikan. Injeksi dilakukan dengan spuit injeksi steril dengan jarum baru pada tiap kali penyuntikan. Semua perlakuan diberikan pada mencit yang berada dalam fase diestrus. Penandaan mencit dilakukan dengan membedakan kandangnya dan mewarnai rambut pada punggung mencit dengan larutan carmin.

Mencit kemudian dikorbankan dengan pembiusan berlebih menggunakan CO₂. Teknik ini dipilih karena mudah digunakan untuk pengorbanan mencit dalam jumlah yang banyak, tidak menimbulkan stres pada mencit dan aman untuk pelaksana dibandingkan metode inhalasi lain. CO₂ yang digunakan dimasukkan/dialirkan ke dalam tempat plastik/logam yang sudah berisi beberapa mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pengorbanan dilakukan pada fase yang sama (diusahakan pada fase proestrus akhir). Mencit yang telah mati ditandai dengan mata redup, reflek pupil negatif, dan denyut jantung negatif. Pengambilan sampel dilakukan yaitu dengan mengambil sampel darah dari jantung dan membedah abdomen untuk pengambilan ovarium kanan dan kiri. Ovarium kemudian dibersihkan dari lemak dan disimpan di larutan Boin (asam pikrat) selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam larutan etanol 70%

sebelum dibuat preparat. Preparat yang dibuat berjumlah minimal tiga preparat/ovarium, sehingga pada satu ekor mencit diambil kedua ovariumnya dan dibuat enam preparat. Metode pembuatan preparat menggunakan metode parafin dengan teknik pewarnaan menggunakan HE (Lampiran 2). Preparat yang telah siap dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop dan hasilnya difoto dengan alat fotografi. Preparat akan diberi kode yang tidak diketahui oleh pemeriksa untuk meningkatkan objektivitas hasil. Pemeriksaan preparat dilakukan oleh dua orang pemeriksa dan dihitung reratanya.

Fotografi preparat histopatologi ovarium yang dipilih harus mewakili tiap kelompok dengan pembesaran yang sama, yaitu 100x atau 400x. Foto yang diambil adalah foto yang paling bagus.

Pengukuran kadar estrogen darah dilakukan setelah mengambil sampel darah jantung dari mencit yang sudah dikorbankan. Sampel darah yang diambil kemudian disentrifus untuk mendapatkan serum sebanyak 200 μ l. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi untuk dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit dengan tujuan didapatkan serumnya. Serum yang didapatkan kemudian dipisahkan dari komponen sel yang mengendap untuk dilakukan pemeriksaan dengan metode Elisa (Gambar 4.4). Sampel yang tidak langsung diperiksa harus disimpan di freezer dengan suhu 0 s.d. -4°C , sedangkan selama transportasi sampel harus disimpan di dalam termos dengan suhu 4°C . Pengukuran kadar estrogen dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 4.4 Pemeriksaan kadar estrogen darah dengan metode Elisa

4.7.3 Cara Pemeriksaan Siklus Estrus Mencit

Pemeriksaan siklus estrus seekor mencit betina dilakukan dengan membuat apusan mukosa vagina untuk mengetahui fase yang sedang berlangsung. Pemeriksaan siklus estrus dilakukan setiap hari pada waktu yang sama. Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengetahui apakah tiap mencit sudah berada pada fase diestrus untuk memulai perlakuan.

Cara memegang mencit saat melakukan tindakan adalah leher mencit dipegang oleh ibu jari dan jari telunjuk, ekor dijepit di antara telapak tangan dan jari kelingking. Posisi mencit telentang dengan bagian ventral menghadap ke atas (Gambar 4.5).

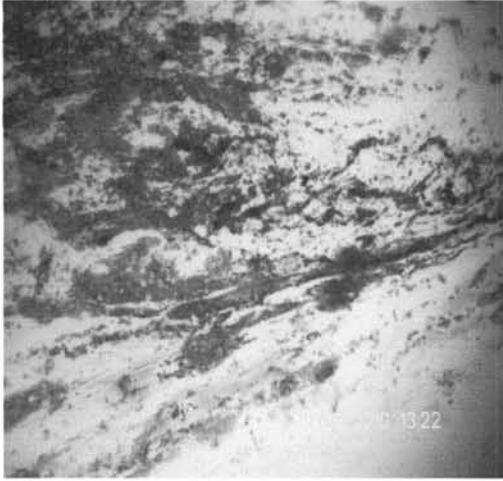
Langkah yang dilakukan adalah dengan membersihkan vulva mencit dengan akuadest, kemudian *cotton bud* yang sudah dibasahi dengan air dimasukkan ke dalam lubang vagina an diputar-putar untuk mendapatkan sel epitel vagina. *Cotton bud* dikeluarkan dari vagina dan dioleskan di permukaan gelas objek.

Permukaan sediaan ditetesi alkohol 70% dan didiamkan 2-3 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir secara perlahan. Permukaan sediaan ditetesi cat Giemsa, didiamkan 2-3 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Sediaan dikeringkan dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100-400x.

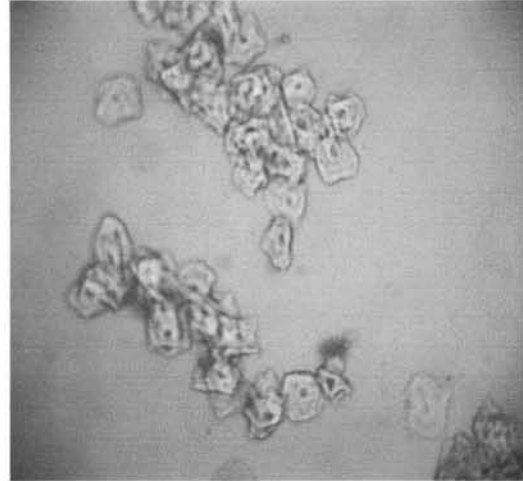


Gambar 4.5 Swab vagina

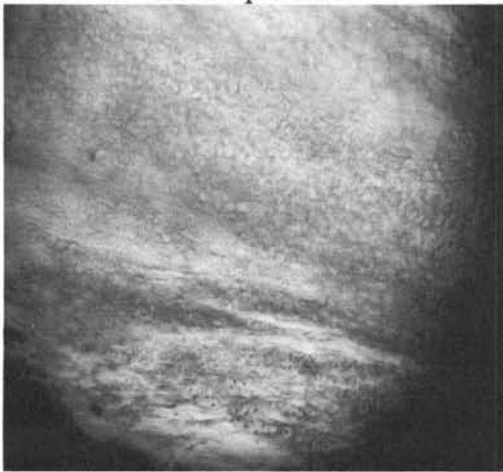
Fase proestrus ditandai dengan adanya sel epitel kecil berinti bulat dan sedikit leukosit. Fase estrus ditandai dengan adanya banyak sel tanduk. Fase metestrus ditandai dengan adanya banyak leukosit dan sedikit sel tanduk, sedangkan pada fase diestrus ditandai dengan adanya banyak leukosit dan sedikit sel epitel (Gambar 4.5) (Fox dan Laird, 1970; Kusumawati, 2004).



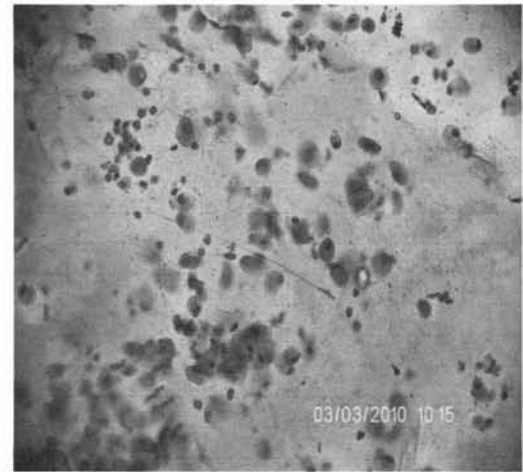
a. Fase proestrus



b. Fase estrus



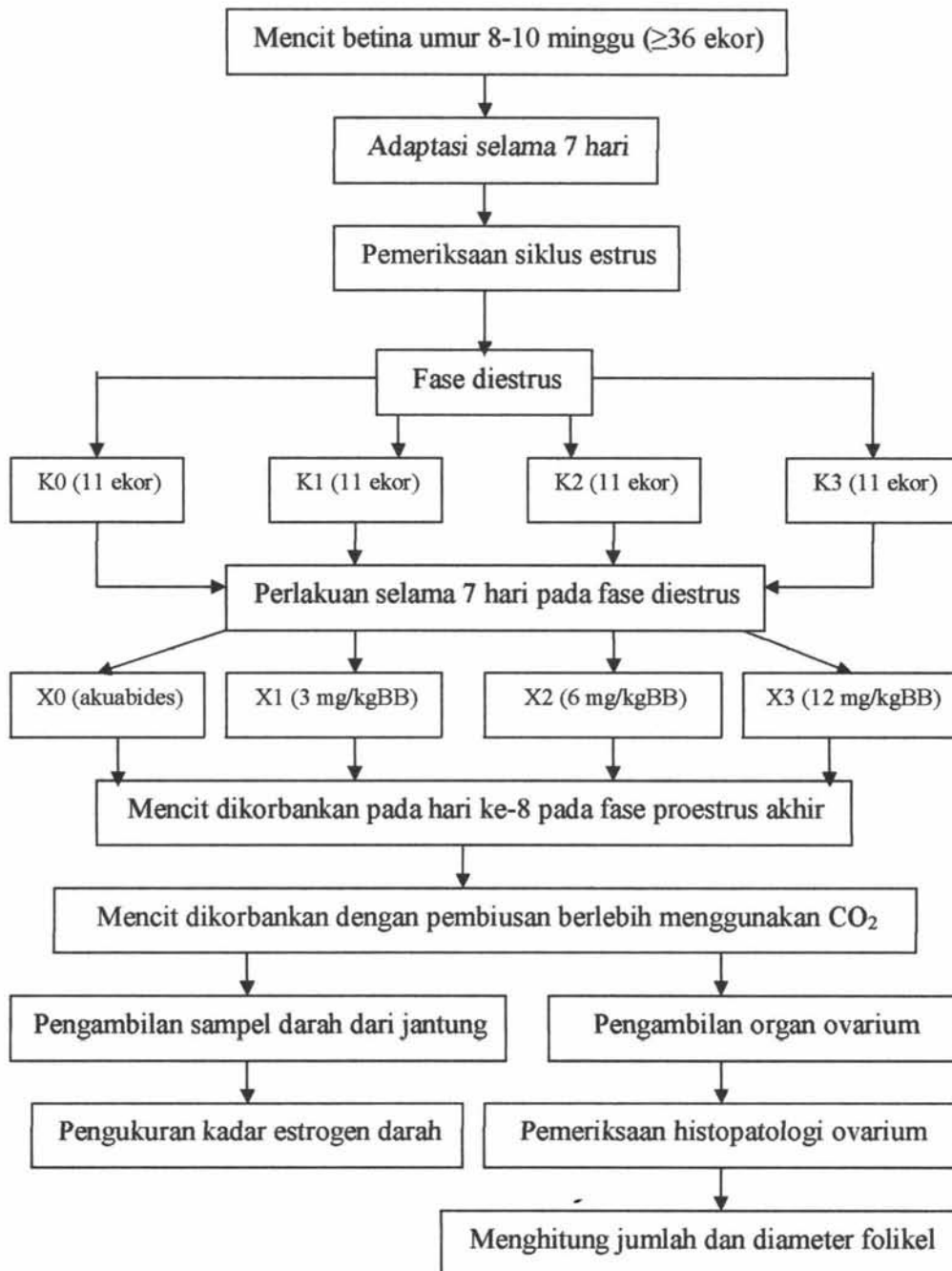
c. Fase metestrus



d. Fase diestrus

Gambar 4.6 Hasil swab vagina mencit (pembesaran 400x)

4.8 Kerangka Operasional



Gambar 4.7 Kerangka operasional penelitian

Pengorbanan diharapkan dapat dilakukan pada fase proestrus akhir/awal estrus karena pada fase tersebut terdapat folikel dominan yang mensekresi estrogen yang banyak. Pengorbanan yang dilakukan pada fase selain proestrus akhir/estrus akan menggambarkan kadar estrogen yang lebih rendah karena tidak memiliki folikel dominan (Salisbury dan VanDemark, 1984).

4.9 Analisis Data

Analisis data untuk mengetahui beda nilai rata-rata jumlah dan diameter folikel (gambaran folikulogenesis) dan kadar estrogen darah pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan dengan uji Anava satu arah. Syarat yang harus dipenuhi untuk uji Anava adalah kelompok yang dibandingkan terdiri lebih dari dua kelompok, data berdistribusi normal, tidak ada korelasi di antara kelompok perlakuan, dan variansnya homogen. Uji Anava yang bermakna secara signifikan akan dilanjutkan dengan uji BNT.

Uji BNT dilakukan untuk mengetahui pada kelompok mana yang berbeda, yaitu kelompok kontrol dengan ketiga perlakuan dan antar kelompok perlakuan itu sendiri. Perbandingan antar kelompok tersebut dapat menggambarkan perlakuan mana yang berbeda dengan perlakuan yang lain, sehingga dapat diketahui pada dosis berapa nikotin dapat menimbulkan efek negatif yang ingin dilihat.

Analisis data untuk melihat adanya korelasi antara jumlah folikel dengan kadar estrogen darah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah dilakukan dengan uji korelasi Pearson. Jumlah dan diameter folikel dikorelasikan secara bersamaan dengan kadar estrogen darah dilakukan dengan uji korelasi ganda

(Dahlan, 2008; Riduwan, 2009). Semua uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95%.

Hipotesis yang digunakan untuk analisis statistik menggunakan satu arah, yaitu mengharapkan efek negatif. Pertimbangannya adalah berdasarkan teori dan kerangka konsep diasumsikan akan terjadi efek negatif akibat pajanan nikotin sehingga sejak awal sudah digunakan hipotesis satu arah.

BAB V
HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

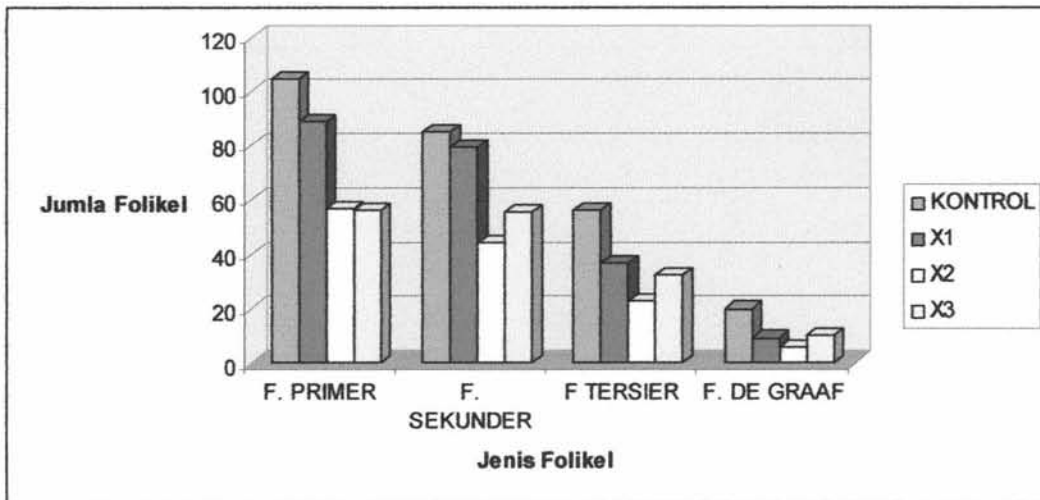


BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

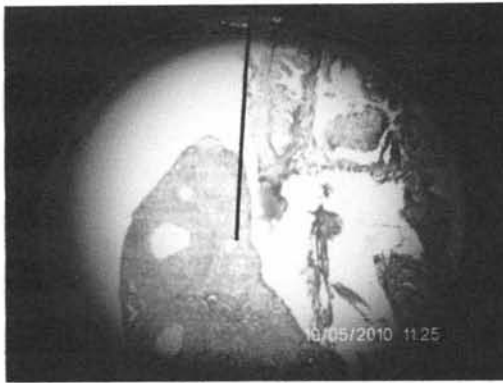
5.1 Data Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada mencit (*Mus musculus*) yang berjumlah 9 ekor/kelompok, terbagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Perlakuan terdiri dari X1 (nikotin 3 mg/kgBB), X2 (nikotin 6 mg/kgBB) dan X3 (nikotin 12 mg/kgBB). Variabel yang diukur adalah jumlah dan diameter folikel ovarium serta kadar estrogen darah mencit.

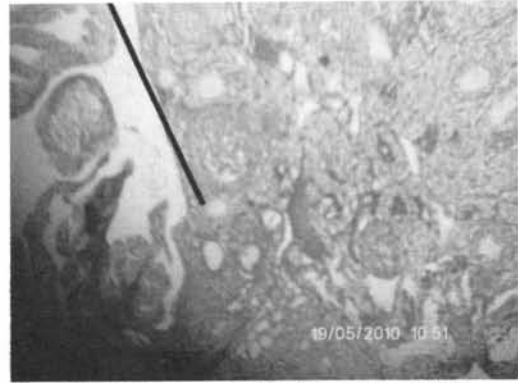


Gambar 5.1 Grafik jumlah folikel ovarium mencit pada semua kelompok perlakuan

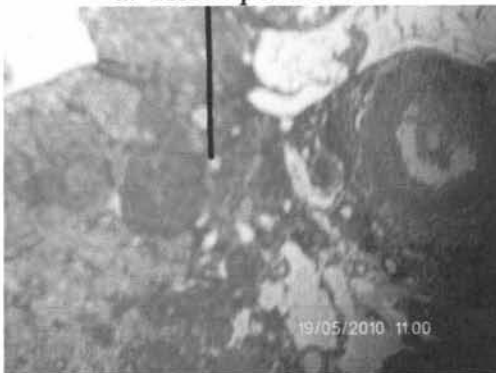
Gambar 5.1. menunjukkan semakin tinggi dosis nikotin yang diberikan maka jumlah folikel ovarium mencit akan semakin sedikit, kemudian jumlahnya akan meningkat sedikit pada dosis tinggi untuk folikel sekunder, tersier, dan de Graaf. Gambaran histologi jumlah folikel ovarium mencit dapat dilihat pada Gambar 5.2. hingga Gambar 5.5.



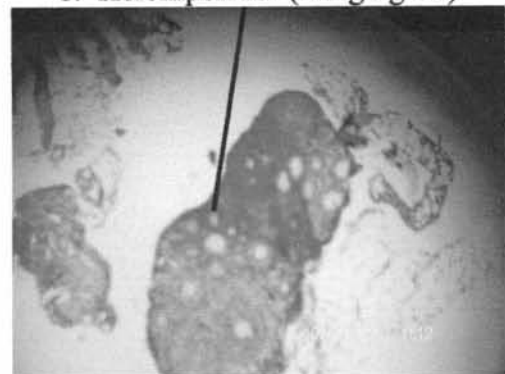
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)



c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)

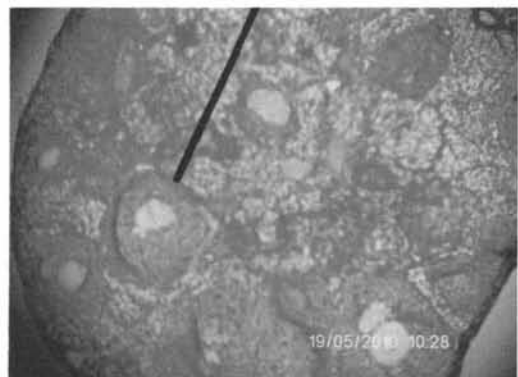


d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

Gambar 5.2 Jumlah folikel primer (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



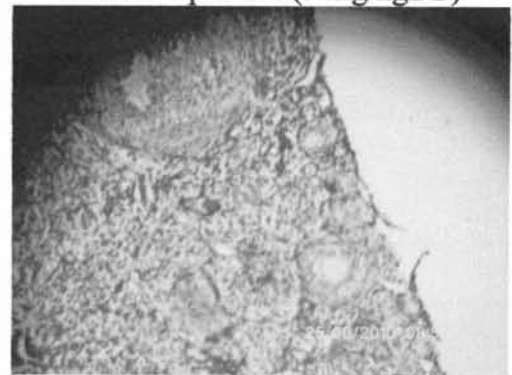
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)



c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)

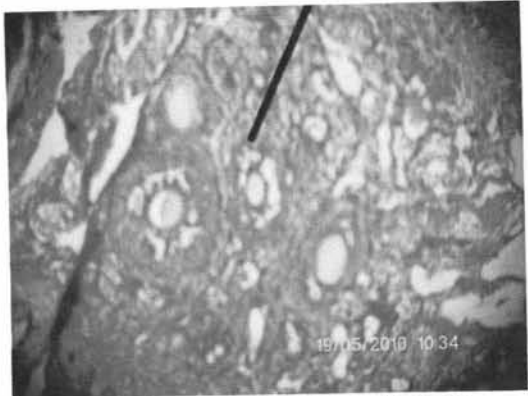


d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

Gambar 5.3 Jumlah folikel sekunder (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



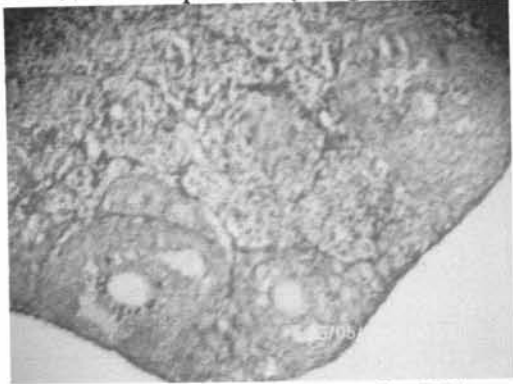
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)



c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)

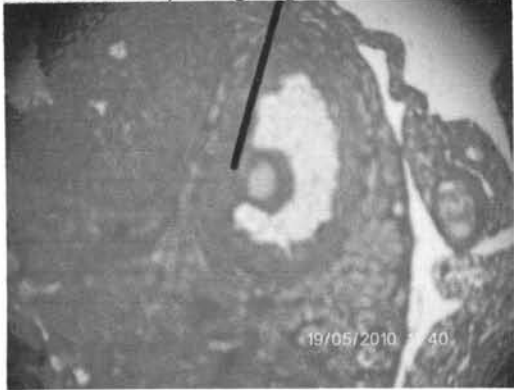


d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

Gambar 5.4 Jumlah folikel tersier (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



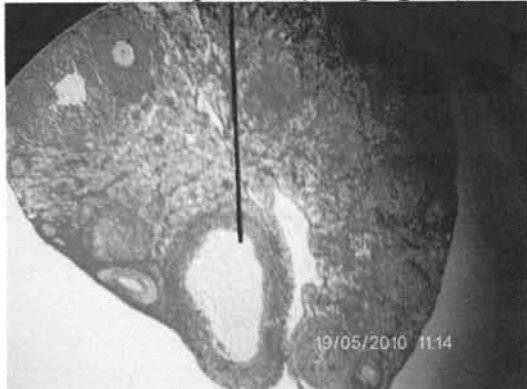
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)



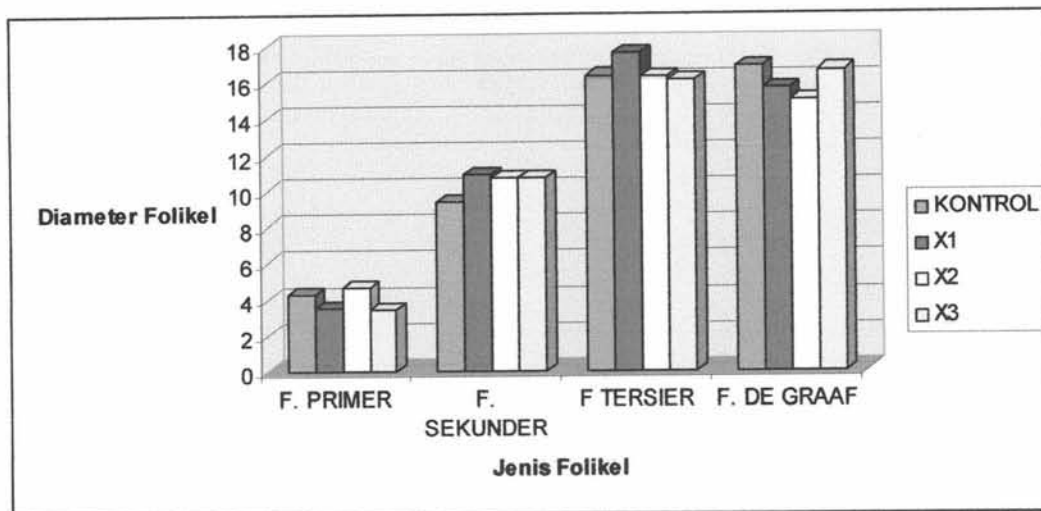
c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)



d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

Gambar 5.5 Jumlah folikel de Graaf (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE

Ukuran diameter folikel ovarium mencit pada berbagai dosis nikotin seperti pada Gambar 5.6. Hasil tersebut diperkuat dengan gambaran histologi diameter ovarium mencit pada Gambar 5.7 hingga Gambar 5.10. yang tidak selalu menunjukkan penurunan ukuran diameter saat dosis nikotin ditingkatkan.

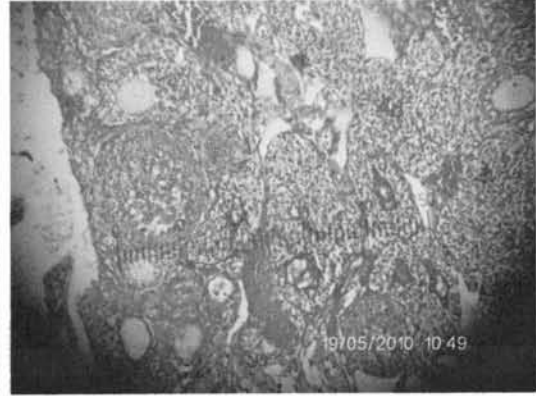


Gambar 5.6. Grafik diameter folikel ovarium mencit (μm) pada berbagai kelompok perlakuan

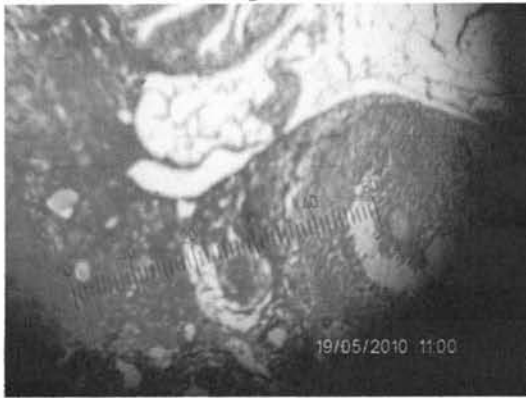
Gambar 5.6 menunjukkan bahwa ukuran diameter folikel tidak menunjukkan pola penurunan yang jelas pada berbagai kelompok perlakuan. Peningkatan dosis nikotin tidak selalu disertai dengan penurunan ukuran diameter. Hasil tersebut akan diperkuat dengan analisis statistik uji komparasi untuk diameter folikel yang tidak menghasilkan perbedaan bermakna.



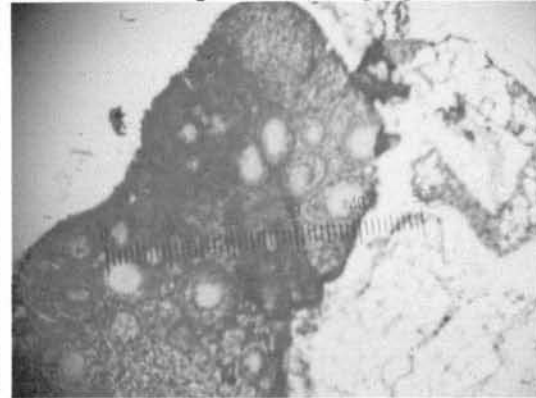
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)

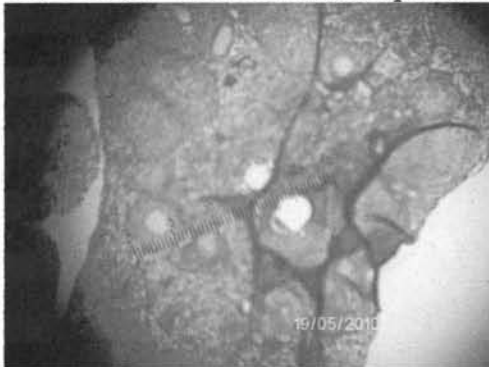


c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)



d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

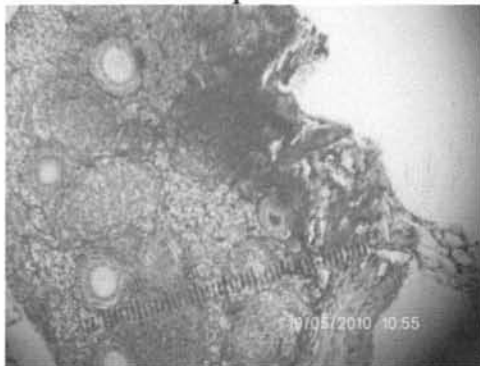
Gambar 5.7 Diameter folikel primer (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



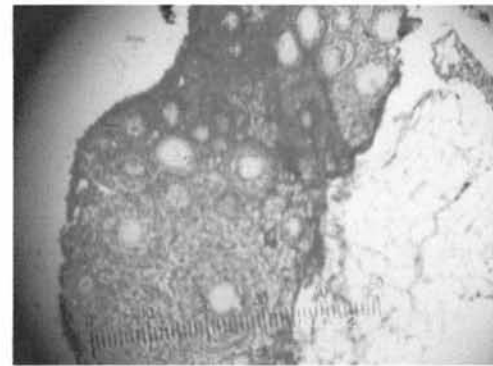
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)

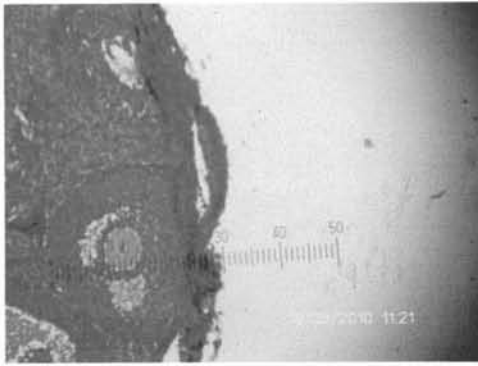


c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)

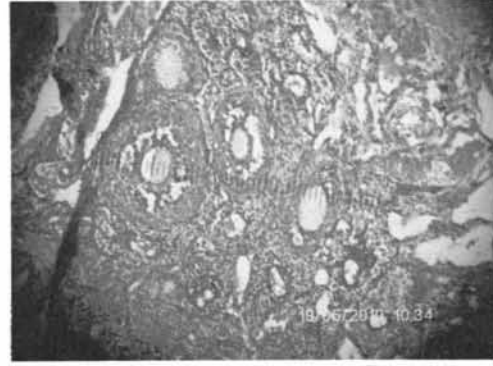


d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

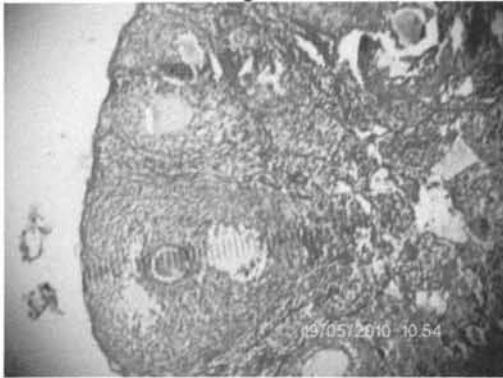
Gambar 5.8 Diameter folikel sekunder (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)

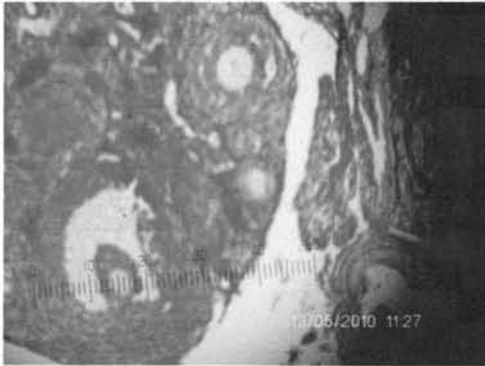


c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)

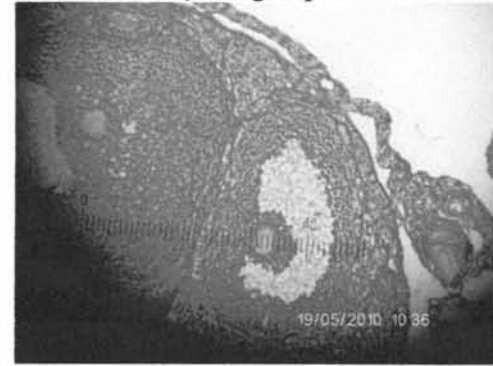


d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

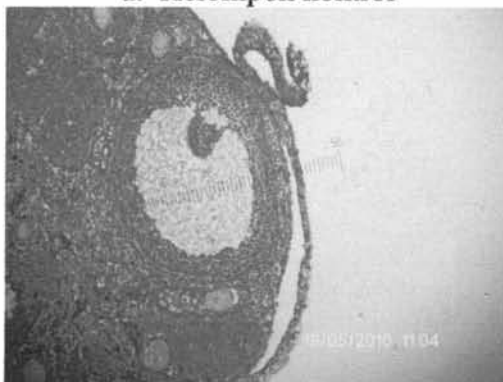
Gambar 5.9 Diameter folikel tersier (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE



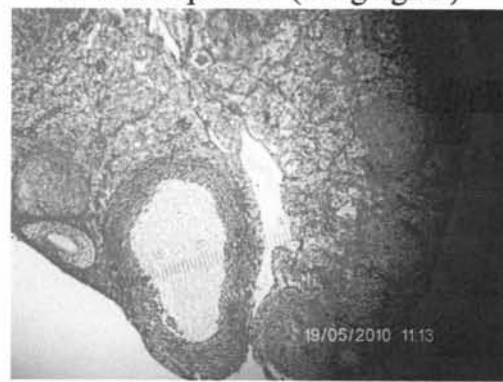
a. Kelompok kontrol



b. Kelompok K1 (3 mg/kgBB)



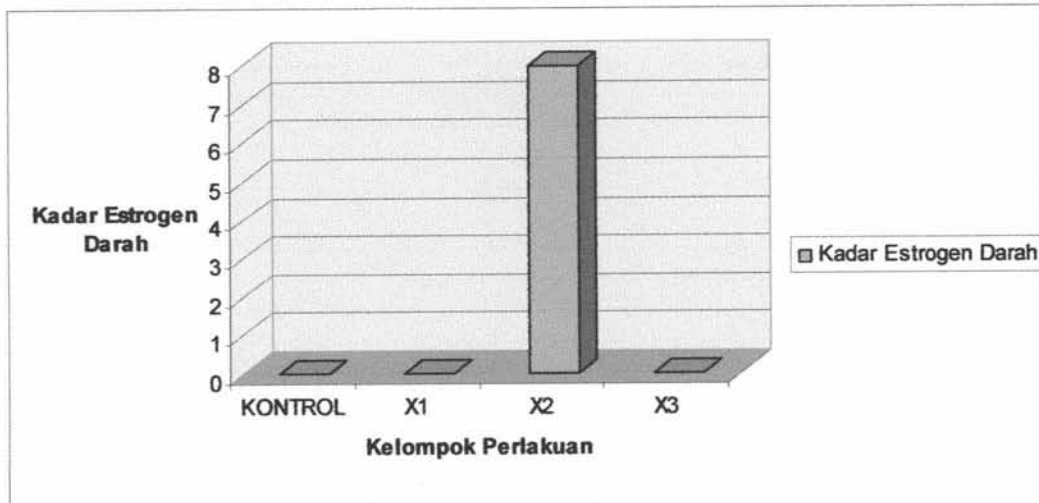
c. Kelompok K2 (6 mg/kgBB)



d. Kelompok K3 (12 mg/kgBB)

Gambar 5.10 Diameter folikel de Graaf (pembesaran 100x) dengan pewarnaan HE

Variabel terakhir yang diukur adalah kadar estrogen darah mencit. Kadar estrogen yang terdeteksi hanya pada K2, yaitu kelompok perlakuan 6 mg/kgBB. Data dari kelompok lain semuanya nol (Gambar 5.11)



Gambar 5.11 Grafik kadar estrogen darah mencit (pg/ml) pada berbagai kelompok perlakuan

Kadar estrogen darah hanya terdeteksi pada sebagian kecil sampel karena pengorbanan dilakukan pada fase diestrus sehingga diasumsikan kadar estrogennya sangat rendah. Fase diestrus tersebut diketahui dengan melakukan swab vagina pada mencit sebelum dikorbankan (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Hasil pemeriksaan swab vagina mencit

PEMERIKSAAN HARI KE-8				
FASE	KONTROL	K1	K2	K3
Proestrus	0	0	0	0
Estrus	0	0	0	0
Metestrus	0	0	0	0
Diestrus	0	4	8	8
PEMERIKSAAN HARI KE-9				
FASE	KONTROL	K1	K2	K3
Proestrus	0	0	0	0
Estrus	0	0	0	0
Metestrus	0	0	0	0
Diestrus	0	4	8	8

Keterangan: total mencit yang dilakukan pemeriksaan swab vagina untuk pengorbanan tahap pertama adalah 20 ekor.

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

Analisis statistik diawali dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas, kemudian jika semua data berada dalam distribusi normal dan variansnya homogen maka akan dilakukan uji Anava satu arah sebagai uji komparasi antar kelompok perlakuan. Uji korelasi Pearson juga dilakukan untuk mengetahui korelasi antara jumlah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah.

Data yang dapat dilakukan uji statistik hanya jumlah folikel, diameter folikel dan kadar estrogen darah pada K2. Kadar estrogen darah pada kelompok kontrol, K1 dan K3 tidak dapat dianalisis secara statistik karena nilainya konstan nol, sehingga tidak dapat diketahui perbedaan kadar estrogen darah di antara semua kelompok perlakuan. Analisis kadar estrogen darah hanya dapat dilakukan secara deskriptif. Semua analisis statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95%. Data yang akan dilakukan analisis statistik seperti pada Tabel 5.2 hingga Tabel 5.4.

SD yang terdapat pada tabel hasil menunjukkan deviasi dari data yang ada, sehingga nilai data yang sebenarnya adalah $\text{mean} \pm \text{SD}$. SD yang besar menunjukkan rentang data yang lebar sehingga akan mempengaruhi hasil dan analisis statistiknya.

Tabel 5.2 Jumlah folikel ovarium mencit

KELOMPOK	JENIS FOLIKEL	JUMLAH SAMPEL	MEAN ± SD
K0	Primer	9	104.4444 ± 25.1799
	Sekunder	9	85 ± 41.7455
	Tersier	9	56.1667 ± 40.5008
	De Graaf	9	20.0556 ± 13.6507
K1	Primer	9	88.7778 ± 27.1651
	Sekunder	9	79.5556 ± 27.3261
	Tersier	9	36.7222 ± 20.6293
	De Graaf	9	9.3333 ± 7.3866
K2	Primer	9	56.6111 ± 21.0398
	Sekunder	9	44.2222 ± 20.6928
	Tersier	9	22.8889 ± 13.6789
	De Graaf	9	6 ± 4.6368
K3	Primer	9	56.1667 ± 30.6686
	Sekunder	9	55.7778 ± 25.381
	Tersier	9	32.2222 ± 19.3522
	De Graaf	9	10.3889 ± 9.0408

Tabel 5.3 Diameter folikel ovarium mencit (µm)

KELOMPOK	JENIS FOLIKEL	JUMLAH SAMPEL	MEAN ± SD
K0	Primer	9	4.2656 ± 0.9581
	Sekunder	9	9.3606 ± 0.9305
	Tersier	9	16.3606 ± 2.6713
	De Graaf	9	16.8561 ± 5.4953
K1	Primer	9	3.4956 ± 1.7408
	Sekunder	9	10.9111 ± 1.8537
	Tersier	9	17.6694 ± 4.485
	De Graaf	9	15.5060 ± 10.1116
K2	Primer	9	4.6717 ± 0.9994
	Sekunder	9	10.7117 ± 2.9322
	Tersier	9	16.2806 ± 4.8063
	De Graaf	9	14.9839 ± 9.7369
K3	Primer	9	3.4322 ± 1.7255
	Sekunder	9	10.7172 ± 1.2875
	Tersier	9	16.0956 ± 3.4993
	De Graaf	9	16.6456 ± 10.0505

Tabel 5.4 Kadar estrogen darah mencit (pg/ml)

	KONTROL	K1	K2	K3
MEAN \pm SD	0	0	8 \pm 6.48	0

5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Uji normalitas yang digunakan adalah *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*. Hasil uji tersebut adalah semua data jumlah folikel, diameter folikel dan kadar estrogen darah pada K2 berada dalam distribusi normal ($p > 0,05$) seperti pada Tabel 5.5, Tabel 5.6 dan Tabel 5.7. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada Lampiran 7 hingga Lampiran 9.

Tabel 5.5 Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas jumlah folikel ovarium mencit

KELOMPOK	JENIS FOLIKEL			
	PRIMER	SEKUNDER	TERSIER	DE GRAAF
K0	0.321	0.776	0.883	0.400
K1	0.540	0.532	0.571	0.414
K2	0.726	0.674	0.535	0.557
K3	0.665	0.339	0.426	0.485

Tabel 5.6 Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas diameter folikel ovarium mencit

KELOMPOK	JENIS FOLIKEL			
	PRIMER	SEKUNDER	TERSIER	DE GRAAF
K0	0.744	0.577	0.623	0.647
K1	0.735	0.658	0.655	0.516
K2	0.664	0.479	0.459	0.801
K3	0.887	0.682	0.607	0.846

Tabel 5.7 Nilai signifikansi (p) hasil uji normalitas kadar estrogen darah mencit

UJI NORMALITAS	KELOMPOK			
	K0	K1	K2	K3
Kolmogorov-Smirnov Z	0	0	0,864	0

Hasil uji homogenitas dari semua data menunjukkan bahwa data tersebut memiliki varians yang homogen ($p > 0,05$) seperti pada Tabel 5.8, sehingga data pada penelitian ini dapat dilanjutkan untuk uji Anava satu arah. Hasil uji homogenitas terdapat pada Lampiran 10.

Tabel 5.8 Nilai signifikansi (p) hasil uji homogenitas jumlah dan diameter folikel ovarium mencit

VARIABEL	JENIS FOLIKEL			
	PRIMER	SEKUNDER	TERSIER	DE GRAAF
Jumlah folikel	0,610	0,942	3,069	2,304
Diameter folikel	2,462	2,887	0,868	0,611

5.2.2 Hasil Uji Anava Satu Arah

Data jumlah dan diameter folikel ovarium dapat dilanjutkan dengan uji parametrik Anava satu arah karena berada dalam distribusi normal dan variansnya homogen. Uji Anava satu arah dilakukan untuk membedakan jumlah dan diameter folikel di tiap kelompok perlakuan pada masing-masing tahapan folikulogenesis.

Hasil uji Anava satu arah terdapat pada Tabel 5.9. Jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf saja yang berbeda bermakna ($p < 0,05$), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji BNT. Variabel yang tidak bermakna dengan uji Anova satu arah tidak diuji BNT. Hasil uji Anova satu arah untuk jumlah dan diameter folikel seperti pada Lampiran 11 dan Lampiran 12.

Tabel 5.9 Nilai signifikansi (p) hasil uji beda antar kelompok

VARIABEL	JENIS FOLIKEL			
	PRIMER	SEKUNDER	TERSIER	DE GRAAF
Jumlah folikel	0,001*	0,020*	0,063	0,019*
Diameter folikel	0,196	0,302	0,826	0,968

Keterangan: *) Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

5.2.3 Hasil Uji BNT

Kelompok data yang bermakna dengan uji Anava satu arah dilanjutkan dengan uji BNT, yaitu data jumlah folikel primer, sekunder, dan de Graaf. Hasil uji BNT terdapat pada Lampiran 13. Perbedaan di antara semua kelompok seperti pada Tabel 5.10 hingga Tabel 5.12. Hasil dikatakan berbeda bermakna jika $p < 0,05$.

Tabel 5.10 Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel primer ovarium mencit

KELOMPOK	NILAI SIGNIFIKANSI (p)	KETERANGAN
K0 – K1	0,215	Tidak ada beda
K0 – K2	0,001	Ada beda
K0 – K3	0,000	Ada beda
K1 – K2	0,014	Ada beda
K1 – K3	0,013	Ada beda
K2 – K3	0,972	Tidak ada beda

Tabel 5.11 Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel sekunder ovarium mencit

KELOMPOK	NILAI SIGNIFIKANSI (p)	KETERANGAN
K0 – K1	0,701	Tidak ada beda
K0 – K2	0,007	Ada beda
K0 – K3	0,046	Ada beda
K1 – K2	0,017	Ada beda
K1 – K3	0,101	Tidak ada beda
K2 – K3	0,417	Tidak ada beda

Tabel 5.12 Hasil uji lanjut menggunakan uji BNT pada jumlah folikel de Graaf ovarium mencit

KELOMPOK	NILAI SIGNIFIKANSI (p)	KETERANGAN
K0 – K1	0,020	Ada beda
K0 – K2	0,003	Ada beda
K0 – K3	0,034	Ada beda
K1 – K2	0,451	Tidak ada beda
K1 – K3	0,811	Tidak ada beda
K2 – K3	0,323	Tidak ada beda

5.2.4 Hasil Uji Korelasi Pearson

Data yang dikorelasikan adalah antara jumlah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah pada kelompok K2, sedangkan pada kelompok kontrol, K1 dan K3 tidak dapat dilakukan uji korelasi karena kadar estrogennya konstan nol. Hasil uji korelasi tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.13 dengan rincian pada Lampiran 14.

Tabel 5.13 Korelasi antara jumlah dan diameter folikel dengan kadar estrogen darah mencit

SIG. KORELASI PEARSON	F. PRIMER	F. SEKUNDER	F. TERSIER	F. DE GRAAF
Jumlah folikel	0.189	0.434	-0.121	0.507
Diameter folikel	0.373	0.556	0.351	0.527

Korelasi antara jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf dengan kadar estrogen darah tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Koefisien korelasi antara jumlah folikel primer dengan kadar estrogen darah menunjukkan korelasi sangat rendah, dengan jumlah folikel sekunder cukup, dengan jumlah folikel tersier sangat rendah dan dengan jumlah folikel de Graaf cukup (Riduwan, 2009).

Korelasi antara diameter folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf dengan kadar estrogen darah juga tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Koefisien korelasi antara diameter folikel primer dengan kadar estrogen darah menunjukkan korelasi rendah, dengan diameter folikel sekunder cukup, dengan diameter folikel tersier rendah dan korelasi dengan diameter folikel de Graaf cukup. Seluruh koefisien korelasi masih $< 0,60$ yang berarti masih belum kuat (Riduwan, 2009).

BAB VI
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Efek Nikotin terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*)

Penelitian ini menunjukkan bahwa pajanan nikotin menyebabkan perbedaan yang bermakna terhadap jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf. Jumlah folikel primer semakin sedikit seiring dengan meningkatnya dosis nikotin. Jumlah folikel sekunder dan de Graaf juga mengalami penurunan pada dosis 3 dan 6 mg/kgBB, kemudian jumlahnya kembali meningkat pada dosis 12 mg/kgBB.

Penurunan jumlah folikel ovarium seiring dengan peningkatan dosis nikotin pada masing-masing tahapan folikulogenesis disebabkan oleh nikotin yang berikatan bersifat pro-oksidan. Pro-oksidan yang masuk ke dalam tubuh akan menyebabkan ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan, sehingga terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif tersebut akan menimbulkan peroksidasi lipid yang dapat merusak sel, dalam hal ini folikel ovarium (Paszkowski dkk., 2002).

Stres oksidatif juga dapat memicu terjadinya apoptosis folikel, sehingga menyebabkan gangguan folikulogenesis, yaitu folikel yang dihasilkan menjadi atresia, degeneratif, dan jumlahnya berkurang (Bordel dkk., 2006; Agarwal dkk., 2008). Gangguan folikulogenesis juga dapat disebabkan oleh gangguan steroidogenesis. Steroidogenesis dapat terganggu akibat nikotin yang mempengaruhi fungsi StAR, sehingga kolesterol sebagai bahan baku steroidogenesis berkurang (Bose dkk., 2007). Akibatnya adalah hormon estrogen yang dihasilkan juga berkurang. Kadar estrogen yang rendah

menyebabkan jumlah reseptor FSH menjadi sedikit, sehingga tidak dapat membentuk folikel dominan dan folikulogenesis terganggu (Guyton dan Hall, 1997; Speroff dan Frits, 2005). Gangguan folikulogenesis yang dapat dilihat adalah dengan semakin sedikitnya jumlah folikel ovarium dengan pemberian nikotin. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Bordel dkk. (2006) yang menyatakan bahwa nikotin dapat mengganggu folikulogenesis.

Jumlah folikel sekunder, tersier dan de Graaf mulai meningkat kembali pada dosis nikotin 12 mg/kgBB. Hal ini disebabkan oleh nikotin dapat meningkatkan kadar FSH sebagai mekanisme pertahanan tubuh terhadap gangguan folikulogenesis yang ditimbulkannya. Penjelasan ini didukung oleh penelitian Windham dkk. (2005) yang membuktikan bahwa kadar FSH urine meningkat 30-35% selama 3-4 siklus menstruasi wanita yang merokok ≥ 10 batang rokok/hari. Kadar FSH tersebut diperiksa pada fase folikular, yaitu hari ke-3 s.d. 5 menstruasi. Kadar FSH yang meningkat ini akan memicu folikulogenesis, sehingga jumlah folikel ovarium bertambah pada dosis nikotin tertentu.

Mekanisme kompensasi tersebut ternyata hanya terjadi pada dosis tinggi, sedangkan pada dosis rendah dan menengah yang diberikan pada penelitian ini belum terjadi kompensasi. Akibatnya adalah jumlah folikel sekunder, tersier dan de Graaf lebih sedikit pada dosis 3 dan 6 mg/kgBB tapi kemudian jumlahnya bertambah lagi pada dosis 12 mg/kgBB. Dosis 12 mg/kgBB tersebut adalah dosis yang dapat menimbulkan kompensasi tubuh. Peningkatan jumlah folikel pada dosis tinggi ini masih tetap lebih rendah daripada jumlah folikel pada kelompok kontrol atau mencit yang tidak terpajan nikotin.

Jumlah folikel primer tetap mengalami penurunan pada dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB. Hal ini disebabkan oleh proses perkembangan folikel primer masih berada pada tahapan *initial recruitment* yang tidak tergantung gonadotropin, sehingga walaupun terjadi peningkatan kadar FSH sebagai kompensasi pajanan nikotin maka jumlahnya tidak akan meningkat (McGee dan Hsueh, 2000).

Pajanan nikotin masih menyebabkan pembentukan folikel dominan, dimana diameternya masih menyerupai ukuran normal, tapi terjadi penurunan jumlah folikel dominan yang terbentuk. Kondisi ini terjadi karena mekanisme pertahanan terhadap stres oksidatif yang berlangsung di dalam folikel. Keseimbangan oksidan dan anti oksidan di dalam cairan folikel sangat mempengaruhi apakah pajanan nikotin akan merusak folikel/tidak. Pajanan nikotin yang menyebabkan proses oksidatif yang lebih dominan mengakibatkan kerusakan sel/apoptosis folikel, sedangkan jika pertahanan anti oksidannya yang lebih dominan maka apoptosis tidak terjadi sehingga perkembangan folikel tetap berlangsung hingga membentuk folikel dominan (Paszkowski dkk., 2002).

Jumlah folikel dominan yang terbentuk pada mencit yang dipajan nikotin lebih sedikit daripada kontrol sehingga fenomena ini menunjukkan kemungkinan proses selanjutnya untuk terjadi penurunan jumlah folikel secara berkesinambungan jika terus terpajan nikotin. Kemungkinan tersebut dapat menyebabkan semakin banyak folikel yang atresia seiring dengan semakin lama pajanan dan besar dosis nikotin yang diberikan. Efek jangka panjang atau *cumulative effect* yang mungkin terjadi adalah folikel ovarium akan habis sebelum usia menopause.

Jumlah folikel tersier tidak berbeda bermakna karena data yang dihasilkan memiliki SD yang besar. SD yang besar tersebut menyebabkan perlunya

perbedaan rentang data yang cukup besar melebihi SD untuk menghasilkan perbedaan yang bermakna di antara kelompok perlakuan.

Perbedaan yang bermakna antara jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf dilanjutkan dengan uji BNT. Hasilnya adalah perbedaan yang bermakna untuk jumlah folikel primer adalah antara kelompok kontrol dengan K2 dan K3, K1 dan K2, serta K1 dan K3. Kelompok kontrol (tanpa perlakuan) berbeda dengan 2 kelompok perlakuan yaitu dosis 6 dan 12 mg/kgBB. Hal ini disebabkan oleh nikotin baru menurunkan jumlah folikel primer pada dosis 6 mg/kgBB sebagai dosis terendah yang berpengaruh. Jumlah folikel primer akibat nikotin dosis 3 mg/kgBB berbeda dengan dosis 6 dan 12 mg/kgBB karena dosis 3 mg/kgBB memberikan efek yang hampir sama dengan tanpa perlakuan, sehingga dosis rendah tersebut memang berbeda dengan 2 dosis lainnya. Jumlah folikel primer dosis 6 dan 12 mg/kgBB tidak berbeda karena dua dosis tersebut memberikan efek yang sama karena folikel primer memang kurang sensitif terhadap pengaruh dari luar. Jumlah folikel primer ternyata turun dengan dosis nikotin minimal 6 mg/kgBB dan dosis yang lebih besar dari dosis tersebut tetap memberikan efek yang sama.

Jumlah folikel sekunder berbeda bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 6 dan 12 mg/kgBB. Dosis 6 mg/kgBB adalah dosis minimal yang dapat menurunkan jumlah folikel sekunder. Antar dosis perlakuan yang bermakna hanya kelompok dosis 3 mg/kgBB dengan dosis 6 mg/kgBB karena dosis 3 mg/kgBB belum memberikan efek sehingga hasilnya hampir sama dengan kontrol. Dosis 3 mg/kgBB tidak berbeda dengan dosis tinggi karena pada

folikel sekunder terjadi peningkatan jumlah folikel jika dibandingkan dengan dosis 6 mg/kgBB sebagai gambaran mekanisme umpan balik.

Jumlah folikel de Graaf hanya berbeda bermakna di antara kontrol dengan ke-3 dosis nikotin, antara dosis nikotin tidak berbeda bermakna. Hal ini disebabkan oleh ketiga dosis tersebut memberikan efek yang sama terhadap folikel de Graaf. Dosis minimal nikotin yang dapat menurunkan jumlah folikel de Graaf adalah 3 mg/kgBB, lebih rendah daripada dosis nikotin yang diperlukan untuk menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder.

Data tersebut menunjukkan folikel de Graaf lebih sensitif terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh nikotin dibandingkan dengan jenis folikel lainnya. Hal ini disebabkan oleh sifat fisiologis folikel de Graaf memang lebih mudah terpengaruh faktor luar dan sangat tergantung dengan hormon gonadotropin (McGee dan Hsueh, 2000).

Dosis nikotin pada penelitian ini dapat dikonversi menjadi dosis manusia, sehingga dapat dijadikan sebagai gambaran berapa banyak nikotin yang terserap untuk menimbulkan penurunan jumlah folikel ovarium. Faktor konversi dari dosis mencit menjadi dosis manusia dengan berat badan 70 kg adalah dikalikan 387,9 (Lampiran 16) (Kusumawati, 2004). Dosis nikotin yang sudah dapat menurunkan folikel de Graaf adalah 3 mg/kgBB, sehingga dosis minimal yang harus didapatkan manusia adalah 1163,7 mg. Nikotin yang terkandung di tiap batang rokok adalah 0,3-2 mg (Hukkanen dkk., 2005), sehingga diperlukan sekitar 582-3879 batang rokok untuk menimbulkan penurunan jumlah folikel de Graaf. Dosis nikotin yang dapat menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder adalah 6 mg/kgBB, sehingga nikotin yang harus diisap manusia sebesar 2327,4 mg.

Dosis tersebut setara dengan 1164-7758 batang rokok. Nikotin/rokok yang diperlukan untuk menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder lebih banyak daripada untuk folikel de Graaf, sehingga folikel de Graaf/folikel dominan akan terpengaruh lebih dulu jika terpajan nikotin/asap rokok.

Jumlah rokok tersebut akan terisap manusia dan mempengaruhi folikulogenesis dalam jangka waktu tertentu sesuai berapa rokok yang diisap perharinya. Faktor lain yang juga mempengaruhi adalah volume rokok yang diisap, dalamnya inhalasi, komposisi udara di ruangan, dan intensitas isapan, dan merk rokok (Hukkanen dkk., 2005).

6.2 Efek Nikotin terhadap Diameter Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa diameter folikel ovarium tidak berbeda secara bermakna pada berbagai kelompok perlakuan, sehingga dapat dikatakan belum terjadi apoptosis yang berarti akibat pajanan nikotin pada penelitian ini. Apoptosis terjadi jika rasio Bax lebih besar daripada BCL2, yang akan membuat sitokrom C keluar dari mitokondria sehingga AIF aktif. AIF akan mengaktifkan caspase 3, 8 dan 9 yang menyebabkan apoptosis terjadi (Bordel dkk., 2005; Agarwal dkk., 2008). Dosis nikotin yang diberikan dan lama pajanan diduga belum dapat meningkatkan rasio Bax/BCL2 secara bermakna sehingga apoptosis yang terjadi belum dapat menyebabkan penurunan ukuran diameter folikel secara bermakna.

Dosis nikotin yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis penelitian Kakisina (2003) yang membuktikan bahwa nikotin dosis 3, 6, dan 12 mg/kgBB

dapat mempengaruhi perkembangan embrio mencit. Dosis tersebut dibuktikan untuk perkembangan embrio, bukan untuk menimbulkan apoptosis pada folikel ovarium sehingga untuk penelitian ini ternyata masih belum bermakna.

Lama pajanan nikotin pada penelitian ini berdasarkan penelitian Bordel dkk. (2006) yang memberikan pajanan nikotin selama 7 hari dan berhasil mempengaruhi folikulogenesis dengan ditemukannya folikel yang apoptosis. Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian Bordel dkk. (2006). Perbedaan hasil tersebut disebabkan oleh metode penelitian yang berbeda. Metode Bordel dkk. (2006) melakukan transplantasi folikel pada dorsal hamster lain yang sudah dipajan nikotin. Folikel ovarium berasal dari hamster yang berbeda dengan hamster yang menjadi tempat transplantasi/hamster yang dipajan nikotin. Penelitian ini melakukan pemeriksaan folikulogenesis pada mencit yang sama dengan mencit yang dipajan nikotin.

Sebab lain yang mungkin adalah perbedaan diameter folikel ovarium yang sangat bervariasi tergantung jumlah lapisannya. Folikel yang mulai memiliki beberapa lapisan adalah sejak perkembangan pada folikel sekunder, yaitu mulai memiliki dua lapis sel/lebih. Lapisan yang bertambah banyak akan menggambarkan diameter yang bertambah besar, sehingga jumlah lapisan juga mempengaruhi ukuran diameter folikel. Bias akibat jumlah lapisan yang bervariasi ini diminimalkan dengan membuat reratanya, walaupun ternyata memang belum dapat memberikan hasil yang mendukung hipotesis.

SD yang besar untuk data diameter folikel juga mempengaruhi hasil sehingga tidak bermakna, karena data memiliki rentang yang lebar. Rentang data yang lebar tidak akan memberikan hasil yang bermakna jika perbedaannya hanya

sedikit, sehingga diperlukan perbedaan yang besar untuk menghasilkan perbedaan bermakna secara statistik.

Pajanan nikotin pada penelitian ini masih menghasilkan folikel de Graaf dengan ukuran diameter yang masih mendekati ukuran normal. Hal ini menggambarkan bahwa pajanna nikotin pada penelitian ini belum menyebabkan atresia folikel de Graaf/folikel dominan secara bermakna. Folikel yang atresia akibat pajanan nikotin tergantung dengan mekanisme keseimbangan prooksidan dan antioksidan intra folikel. Folikel yang memiliki antioksidan lebih banyak berperan maka tidak akan terjadi apoptosis dan folikel tetap berkembang sehingga masih terbentuk folikel dominan. Folikel dengan antioksidan yang lebih sedikit akan memicu apoptosis dan folikel tidak dapat berkembang (Paszkowski dkk., 2002).

6.3 Efek Nikotin terhadap Kadar Estrogen Darah Mencit (*Mus musculus*)

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa data kadar estrogen darah tidak dapat diolah secara statistik karena nilainya nol pada kelompok kontrol, K1 dan K3. Rerata kadar estrogen hanya terdapat pada kelompok K2, yaitu 8 pg/ml. Hal ini disebabkan oleh waktu pengorbanan mencit terjadi pada fase diestrus. Fase diestrus adalah fase dimana korpus luteum telah terbentuk sempurna. Hormon yang dihasilkan pada fase ini adalah progesteron. Estrogen dihasilkan dalam keadaan minimal (Salisbury dan VanDemark, 1984; Kusumawati, 2004).

Pengukuran kadar estrogen pada fase diestrus tidak menggambarkan kadar estrogen yang optimal karena tidak terdapat folikel dominan yang menghasilkan estrogen yang optimal. Estrogen akan diproduksi optimal pada fase proliferasi

dan menjelang ovulasi, yaitu pada fase proestrus akhir atau fase estrus (Salisbury dan VanDemark, 1984; Kusumawati, 2004).

Pengorbanan mencit awalnya diharapkan dapat berada pada fase proestrus akhir atau estrus, tapi pada kenyataannya pada hari ke-8 atau satu hari setelah perlakuan selesai, hasil swab vagina mencit menunjukkan bahwa mencit yang diberikan nikotin 3, 6 dan 12 mg/kgBB berada pada fase diestrus. Swab vagina diulang kembali pada hari ke-9, diharapkan sudah masuk ke dalam fase proestrus. Hasil swab vagina tersebut tetap menunjukkan bahwa mencit yang dipajan nikotin lebih dominan berada pada fase diestrus (Tabel 5.1). Pengorbanan kemudian dilakukan pada fase diestrus untuk semua kelompok. Kelompok kontrol akhirnya juga dikorbankan dengan mengikuti fase pengorbanan kelompok perlakuan, yaitu fase diestrus.

Data tersebut menunjukkan adanya kemungkinan perpanjangan siklus estrus dari mencit yang diberikan perlakuan nikotin, sehingga lama fase diestrusnya memanjang. Siklus estrus mencit yang normal akan berlangsung selama 4-5 hari (Kusumawati, 2004; Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Lama siklus mencit yang paling sering ditemukan adalah 4 hari.

Mencit yang digunakan untuk penelitian ini awalnya seragam berada pada fase diestrus, jika selesai dalam 2 siklus memerlukan waktu 8 hari dan akan berada pada fase proestrus pada hari ke-9. Mencit yang akan dikorbankan masih berada pada fase diestrus pada hari ke-9 dan tidak diketahui pada hari keberapa akan memasuki fase proestrus, sehingga diduga mencit tersebut mengalami perpanjangan siklus estrus.

Perpanjangan fase tersebut disebabkan oleh masuknya nikotin yang dapat mengganggu proses folikulogenesis dan steroidogenesis, sehingga perkembangan folikel dan sintesis hormon steroid terhambat (Paszkowski dkk., 2002). Folikulogenesis dan steroidogenesis berlangsung pada fase proestrus (Salisbury dan VanDemark, 1984; Fox dan Laird, 1970). Proses folikulogenesis dan steroidogenesis yang terhambat pada penelitian ini digambarkan dengan siklus estrus mencit yang tidak berada pada fase proestrus untuk memulai perkembangan folikel dan sintesis hormon steroid. Hambatan kedua proses tersebut digambarkan dengan terdeteksinya fase diestrus pada swab vagina. Kelemahan penelitian ini adalah tidak mengukur lama siklus yang dilalui mencit dari awal hingga akhir siklus, sehingga belum dapat diketahui secara pasti apakah terjadi perpanjangan/tidak dan pada fase mana perpanjangan itu berlangsung.

Rerata kadar estrogen darah yang terdeteksi pada K2 adalah 8 pg/ml. Nilai ini lebih rendah daripada kadar estrogen darah dalam keadaan normal tanpa pajanan nikotin, yaitu 15-16 pg/ml pada fase diestrus. Nilai 8 pg/ml tersebut setara dengan kadar estrogen darah mencit pada masa menopause (Mahaputra, 2008).

Kadar estrogen yang lebih rendah akibat pajanan nikotin disebabkan oleh nikotin dapat menghambat sintesis estrogen di mitokondria sel teka dengan mengganggu fungsi StAR. StAR dalam keadaan normal berfungsi membantu transport kolesterol ke dalam mitokondria untuk dijadikan sebagai bahan baku sintesis estrogen. StAR yang terganggu akibat pajanan nikotin menyebabkan ekspresi StAR dan interaksi StAR dengan mitokondria juga terganggu. Kadar estrogen yang dihasilkan dalam steroidogenesis akhirnya akan lebih rendah karena bahan bakunya telah berkurang (Bose dkk., 2007). Pilihan hormon yang

sebaiknya diukur untuk hewan coba yang berada pada fase diestrus saat pengorbanan adalah hormon progesteron karena kadarnya tinggi pada fase diestrus.

Sebab lain tidak terdeteksinya hormon estrogen pada penelitian ini adalah teknik pengukuran hormon yang digunakan adalah Elisa. Teknik ini terutama teknik *double antibody sandwich Elisa* diaplikasikan secara klinis untuk pengukuran hormon dengan molekul yang besar (Handoyo, 2003).

Estrogen adalah hormon dengan molekul kecil, sehingga kemungkinan teknik Elisa yang digunakan kurang sensitif untuk hormon ini terutama jika kadarnya di dalam sampel rendah. Peneliti menggunakan teknik Elisa karena *kit* yang tersedia di laboratorium untuk pengukuran hormon estrogen adalah Elisa. Kendala atau keterbatasan penelitian ini adalah dana dan waktu. Dana menjadi kendala karena jika harus mengulang pengukuran hormon estrogen maka akan memerlukan dana yang besar dengan mengulang penelitian dari awal. Waktu menjadi kendala karena *kit* yang tersedia adalah Elisa, jika menunggu *kit* lain (RIA) maka akan menunggu pemesanan kit tersebut. Akibatnya adalah lama penelitian akan bertambah, dengan demikian peneliti tetap menggunakan Elisa dengan konsekuensi yang mungkin terjadi.

6.4 Korelasi antara Jumlah dan Diameter Folikel dengan Kadar Estrogen Darah Mencit (*Mus musculus*)

Data yang dapat dilakukan uji korelasi hanya data jumlah dan diameter folikel terhadap kadar estrogen darah pada K2. kelompok kontrol, K1 dan K3 tidak dapat dilakukan uji korelasi karena kadar estrogen darahnya konstan nol. Hasil statistik

tidak menunjukkan adanya korelasi yang signifikan antara jumlah folikel dengan kadar estrogen darah atau diameter folikel dengan kadar estrogen darah.

Koefisien korelasi di antara keduanya masih di bawah 0,60. Maknanya adalah kekuatan korelasinya cukup (belum kuat). Koefisien korelasi antara diameter folikel dengan kadar estrogen darah lebih besar daripada koefisien korelasi antara jumlah folikel dengan kadar estrogen darah, walaupun bedanya tidak terlalu besar. Hal ini menunjukkan bahwa diameter folikel lebih banyak mempengaruhi sintesis hormon estrogen daripada jumlah folikel.

Folikel yang berukuran lebih besar (folikel dominan) akan memproduksi hormon estrogen yang lebih banyak, sehingga diameter folikel sangat mempengaruhi kadar estrogen darah. Jumlah folikel memiliki peran yang lebih kecil daripada diameter folikel karena folikel yang tidak mampu menjadi folikel dominan akan menjadi atresia dan jumlahnya berkurang, karena yang diharapkan adalah folikel dengan antrum yang besar (Guyton dan Hall, 1997; Sperof dan Frits, 2005).

Kadar estrogen yang rendah pada hasil penelitian ini dipengaruhi oleh diameter folikel yang kecil dan jumlah folikel yang sedikit akibat pajanan nikotin, karena secara teori jumlah dan diameter folikel secara bersamaan mempengaruhi sintesis estrogen. Hasil penelitian ini belum dapat membuktikan secara bermakna kekuatan korelasi di antara keduanya karena semua koefisien korelasinya masih belum kuat. Hal ini dapat disebabkan oleh besar dan selisih dosis nikotin serta lama pajanan yang masih belum dapat memberikan efek bermakna terhadap folikulogenesis secara keseluruhan.

Sebab lain adalah pengorbanan di fase diestrus yang menyebabkan tidak semua kadar estrogen darah terdeteksi. Data tersebut menjadi kurang optimal untuk dikorelasikan. Pengorbanan pada fase proestrus/estrus dimana terdapat folikel dominan memungkinkan terdeteksinya kadar estrogen darah yang optimal sehingga data yang dikorelasikan lebih baik.

Penelitian ini sebenarnya secara keseluruhan memiliki kelebihan, yaitu melakukan pemeriksaan folikulogenesis yang meliputi jumlah dan diameter folikel, dan memeriksa kadar estrogen darah sekaligus. Analisis statistik dilakukan dengan mengkomparasikan hasil di antara beberapa kelompok perlakuan dan mengkorelasikan beberapa variabel yang diukur.

Kelemahan penelitian secara keseluruhan, sejak dimulainya perlakuan dan hasil yang diperoleh (gambaran folikulogenesis dan kadar estrogen darah) adalah waktu awal perlakuan dan pengorbanan, lama pajanan, dana, dan waktu penelitian. Awal perlakuan diberikan pada fase diestrus yang memiliki durasi yang panjang (57-60 jam). Peneliti tidak dapat mengetahui mencit yang digunakan berada pada awal, tengah, atau akhir diestrus sehingga selisih waktu awal perlakuan di antara semua sampel sangat berpengaruh walaupun sama-sama berada pada fase diestrus. Waktu pengorbanan yang diharapkan berada fase proestrus akhir/estrus tidak terpenuhi, sehingga dikorbankan pada fase dimana mencit bertahan setelah perlakuan, yaitu fase diestrus tanpa mengetahui apakah berada di awal, tengah atau akhir diestrus. Konsekuensinya adalah pada fase ini kadar estrogen darah sedikit dan selisih waktu diestrus yang dialami mencit cukup panjang, sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian (SD menjadi besar).

Lama pajanan yang diberikan adalah tujuh hari, berdasarkan penelitian Bordel dkk. (2006) yang membuktikan bahwa pajanan nikotin selama tujuh hari dapat mempengaruhi perkembangan folikel yang dilakukan pada hamster, diketahui dengan terjadinya apoptosis folikel. Lama pajanan selama tujuh hari tersebut setelah dilakukan pada penelitian ini ternyata masih belum dapat memberikan efek yang nyata terutama terhadap penurunan ukuran diameter dan kadar estrogen darah. Teknik penelitian Bordel dkk. (2006) dan penelitian ini berbeda, sehingga untuk memberikan efek yang nyata diasumsikan harus menambah lama pajanan nikotin.

Dana dan waktu juga merupakan kelemahan penelitian ini, karena setelah melihat hasil penelitian yang masih belum dapat mendukung hipotesis maka penelitian tidak diulang dan tetap membahas dengan hasil yang ada. Pengulangan penelitian akan memakan dana dan waktu yang tidak sedikit, sehingga diputuskan untuk tidak menambah waktu/mengulang penelitian dari awal.

Beberapa hasil yang tidak sesuai hipotesis membuat peneliti harus mengkaji manfaat yang diperoleh berdasarkan hasil tersebut. Manfaat akademis yang didapatkan dari penelitian ini adalah mekanisme nikotin terhadap penurunan jumlah folikel ovarium. Mekanisme nikotin terhadap diameter folikel, kadar estrogen darah dan korelasi di antara kedua faktor tersebut masih belum dapat dijelaskan secara bermakna berdasarkan analisis statistik. Manfaat praktis yang diharapkan didapatkan dari penelitian ini masih dapat diperoleh karena nikotin memang terbukti menurunkan jumlah folikel ovarium sehingga dampak selanjutnya dapat menimbulkan infertilitas pada wanita. Hasil ini dapat digunakan sebagai dasar motivasi masyarakat untuk mengurangi konsumsi rokok.

**BAB VII
PENUTUP**

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah:

1. Nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB menurunkan jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf tapi tidak menurunkan jumlah folikel tersier pada proses folikulogenesis mencit.
2. Nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB tidak menurunkan ukuran diameter folikel pada proses folikulogenesis mencit.
3. Kadar estrogen darah mencit yang terpajan nikotin dosis 6 mg/kgBB lebih rendah daripada nilai normal, yaitu 8 pg/ml.
4. Jumlah folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB tidak berkorelasi dengan kadar estrogen darah mencit.
5. Diameter folikel pada proses folikulogenesis akibat pajanan nikotin dosis 3, 6 dan 12 mg/kgBB tidak berkorelasi dengan kadar estrogen darah mencit.

7.2 Saran

Saran yang diajukan peneliti adalah berdasarkan hasil penelitian ini nikotin dengan dosis 3, 6, dan 12 mg/kg BB/hari minimal selama tujuh hari dapat menurunkan jumlah folikel ovarium, sehingga konsumsi rokok akan memberi efek terhadap infertilitas, dalam hal ini menggunakan mencit betina sebagai model. Dosis mencit tersebut dapat dikonversi menjadi dosis manusia yang diasumsikan akan mempengaruhi infertilitas wanita jika nikotin terpapar pada

manusia. Kebijakan konsumsi rokok harus lebih diperhatikan untuk menghindari efek negatif yang lebih lanjut, salah satunya dengan UU tentang konsumsi rokok. Beberapa saran yang diajukan untuk perbaikan penelitian serupa yang akan datang adalah:

1. Pemilihan besar dan selisih dosis nikotin antar perlakuan serta lama pajanan agar dapat memberikan perbedaan yang bermakna terhadap hasil penelitian.
2. Pengukuran kadar hormon dalam darah yang dianjurkan jika hewan coba berada pada fase diestrus saat pengorbanan adalah hormon progesteron karena pada fase diestrus hormon tersebut banyak diproduksi.
3. Penelitian lain dengan menggunakan nikotin sebagai perlakuan dapat dilakukan untuk menghitung lama siklus estrus yang terjadi akibat pajanan nikotin, baik itu semua fase atau hanya pada fase tertentu sehingga dapat diketahui apakah terjadi perpanjangan siklus/tidak secara pasti, dan fase mana yang mengalami perpanjangan waktu.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Acosta E, Pena O, Naftolin F, Avila J. and Palumbo A, 2009. Angiotensin II induces apoptosis in human mural granulosa-lutein cells, but not in cumulus cells. *Fertility and Sterility* 91 (5): 1984-1989.
- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, and Shah R, 2008. Comprehensive invited review: redox consideration in female reproduction function and assisted reproduction from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 10 (8): 1375-1401.
- Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP and Mutturishna S, 2008. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility* 89 (4): 912-921.
- Augood C, Duckitt K, and Templeton AA, 1998. Smoking and female infertility: a systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 13 (6): 1532-1539.
- Bordel R, Laschke MW, Menger MD and Vollmar B, 2006. Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Human Reproduction* 21 (3): 610-616.
- Bose M, Debnath D, Chen Y and Bose HS, 2007. Folding, activity and import of steroidogenic acute regulatory protein into mitochondria changed by nicotine exposure. *Journal of Molecular Endocrinology* 39: 67-79.
- Budiarto E, 2003. *Metodologi penelitian kedokteran, sebuah pengantar*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 15.
- Campo S, Loreti N, Andreone L, 2009. Ovarian endocrine activity: role of follistatin, activin and inhibin. In: *Reproductive endocrinology, a molecular approach*. New York: Springer, 249-255.
- Chen C, Wang X, Wang L, Yang F, Tang G, Xing H, Ryan L, Lasley B, Overstreet JW, Stanford JB and Xu X, 2005. Effect of environmental tobacco smoke on levels of urinary hormone markers. *Environmental Health Perspectives* 113 (4): 412-416.
- Cunningham FG, MacDonald PC and Gant NF, 1995. *Obstetri williams edisi 18*. Jakarta: EGC, 1084-1105.
- Dahlan S, 2008. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika, 4.

- Depkes RI dan WHO, 2003. *Konsumsi tembakau dan prevalensi merokok di Indonesia*. 1-2.
- Dharma SJ, Modi DN and Nandedkar TD, 2009. Gene expression profiling during early folliculogenesis in the mouse ovary. *Fertility and Sterility* 91 (5): 2025-2036.
- ESHRE Capri Workshop Group, 2002. Physiopathological determinants of human infertility. *Human Reproduction Update* 8 (5): 435-447.
- Fabro S, 1978. Penetration of chemicals into the oocyte, uterine fluid, and preimplantation blastocyst. *Environmental Health Perspectives* 24: 25-29.
- Fajriwan dan Jusuf A, 1990. Merokok Pasif. *J. Respir Indo* 19: 22-25.
- FBI, 2009. *Daftar 10 besar negara perokok*. www.forumbebas.com. Available on 23 Januari 2010.
- Fox RR and Laird CW, 1970. *Sexual cycles. In: reproduction and breeding technique for laboratory animals 3th edition*. Philadelphia: Lea and Febiger, 115-117.
- Gant NF and Cunningham FG, 1993. *Basic gynecology and obstetric*. Connecticut: Prentice-Hall International Inc, 143-151.
- Garor R, Abir R, Erman A, Felz C, Nitke S and Fish B, 2009. Effects of basic fibroblast growth factor on in vitro development of human ovarian primordial follicles. *Fertility and Sterility* 91 (5): 1967-1975.
- Granner DK, 2003. *The diversity of the endocrine system in: harper's illustrated biochemistry twenty-sixth edition*. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, 444.
- Guyton AC dan Hall JE, 1997. *Buku ajar fisiologi kedokteran edisi 9*. Jakarta: EGC, 1285-1290.
- Hamilton D and Fairley, 2004. *Lectures note obstetrics and gynaecology second edition*. Oxford: Blackwell Publishing, Ltd, 3-4.
- Handojo, I, 2003. *Pengantar imunoasai dasar*. Surabaya: Airlangga University Press, 112.
- Hukkanen J, Jacob III P and Benowitz NL, 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological Reviews* 57 (1): 79-115.
- Johnson MH and Everitt BJ, 2000. *Essential reproduction*. Oxford: Blacwell Science Ltd, 36.

- Kakisina P, 2003. Pengaruh nikotin terhadap perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*). Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kemas AS, 1991. *Rancangan percobaan*. Jakarta: Rajawali Press, 19-52.
- King SR and Lavoie HA, 2009. *Regulation of the early steps in gonadal steroidogenesis*. In: *Reproductive endocrinology, a molecular approach*. New York: Springer, 175.
- Kusumawati D, 2004. *Bersahabat dengan hewan coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 5-6, 43, 49-50, 67-68.
- Mahaputra, L, 2008. *Catatan kuliah biologi reproduksi hewan*. Surabaya: S2 IKR Unair.
- Maheshwari A, Hamilton M, and Battacharya S, 2008. Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human Reproduction* 23 (3): 538-542.
- Mailhes JB, Young D, Caldito G, London SN, 2000. Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Human Reproduction* 6 (3): 232-237.
- Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y and Manabe N, 2006. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro and anti apoptotic molecules. *Journal of Reproduction and Development* 52 (6): 695-705.
- McGee EA and Hsueh AJW, 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21 (2): 200-214.
- Mehring PM, 2003. *Alterations in female reproductive system in: essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 605-607.
- Miceli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G, Sagnella F, Tiberi F, Bompiani A, Mancuso S, Lanzone A and Apa R, 2005. Effects of nicotine on human luteal cells *in vitro*: a possible role on reproductive outcome for smoking women. *Biology of Reproduction* 72: 628-632.
- Neal MS, Zhu J, Holloway AC and Foster WG, 2007. Follicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat follicle culter assay. *Human Reproduction* 22 (4): 961-967.
- Paszkowski T, Clarke RN and Hornstein MD, 2002. Smoking induces oxidative stress inside the graafian follicle. *Human Reproduction* 17 (4): 921-925.

- Pemkot Surabaya, 2008. *Peraturan daerah kota Surabaya nomor 5 tahun 2008 tentang kawasan tanpa rokok dan kawasan terbatas merokok*. Surabaya: Pemerintah Daerah Kota Surabaya, 1-14.
- Rabinoff M, Caskey N, Rissling A and Park C, 2007. Pharmacological and chemical effects of cigarette additives. *American Journal of Public Health* 97 (11): 1981-1988.
- Riduwan, 2009. *Dasar-dasar statistika*. Bandung: Penerbit Alfabeta, 217-222; 238-243.
- Riveles K, Roza R and Talbot P, 2005. Phenols, quinolines, indoles, benzene, and 2-cyclopenten-1-ones are oviductal toxicants in cigarette smoke. *Toxicological Sciences* 86 (1): 141-151.
- Rushton L, 2004. *The endocrine system*. Philadelphia: Chelsea House Publisher, 66-68.
- Saatli B, Kizildag S, Posaci C, Dogan E, Koyuncuoglu M, Ulukus EC and Atabey N, 2009. Long-term effects of gnRH agonist, gnRH antagonist, and estrogen plus progesterone treatment on apoptosis related genes in rat ovary. *Fertility and Sterility* 91 (5): 2006-2011.
- Salisbury GW dan VanDemark NL, 1984. *Fisiologi reproduksi dan inseminasi buatan pada sapi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 53-55.
- Smith JB dan Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia, 10-36.
- Speroff L and Fritz MA, 2005. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility seventh edition book 1 and 2*. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 25-40; 104-109; 187-224; 1013-1014.
- Sugiyono, 2008. *Metode penelitian kuantitatif kualitatif dan R&D*. Bandung: Penerbit Alfabeta, 72-80.
- Tesone M, Abramovich D, Irusta G, Parborell F, 2009. *Autocrine and paracrine regulation of the ovary*. In: *Reproductive endocrinology, a molecular approach*. New York: Springer, 241-246.
- Tjokroprawiro A, Pudjirahardjo WJ, dan Putra ST, 1996. *Pedoman penelitian kedokteran*. Surabaya: Airlangga University Press, 54-56.
- Valdez KE, Cuneo SP and Turzillo AM, 2005. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. *Reproduction* 130: 71-81.

- Vasquez J, 2008. *Human rights and health: persons exposed to second-hand tobacco smoke*. Washington DC: Pan American Health Organization, 1-8.
- WHO, 2000. *Air quality guidelines second edition*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
- Wiknjosastro H, 1997. *Ilmu kandungan edisi kedua cetakan kedua*. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, 74-76.
- Windham GC, Mitchell P, Anderson M and Lasley BL, 2005. Cigarette smoking and effects on hormone function in premenopausal woman. *Environmental Health Perspectives* 113 (10): 1285-1290.
- Yahya H, 2003. *The miracles of hormones*. New Delhi: Goodword Books, 118-123.
- Zenzen MT, Reed TE and Casper NF, 1997. Effects of cigarette smoking and age of the maturation of human oocytes. *Human Reproduction* 12 (8): 1736-1741.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur pembuatan larutan nikotin

Cara pembuatan larutan dengan dosis 12 mg/kgBB dengan bahan nikotin yang berbentuk cair dengan kemurnian 97%:

$$\text{BM nikotin} = 58,464$$

$$\text{BJ nikotin} = 1,008$$

Dosis 12 mg/kgBB, akan disuntikkan 0,1 ml/10 g BB = 10 ml/kgBB (10 g ~ 0,1 ml), 1 kg (1000 gr) ~ 10 ml; 1000 g/10 g x 0,1 ml = 10 ml; artinya dalam 10 ml larutan mengandung 12 mg nikotin maka:

$$\begin{aligned} 12 \text{ mg/kgBB} &= 0,012 \text{ g} \\ &= 0,012/1,008 \\ &= 0,01190476 \text{ ml} \end{aligned}$$

Karena nikotin yang tersedia kemurnian 97% maka harus diambil:

$$\begin{aligned} &= 0,01190476 \text{ ml} \times 100/97 \\ &= 0,01227295 \text{ ml} \\ &= 12,27295 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 10 ml larutan dosis 12 mg/kgBB dengan cara mengambil 12,27295 μl larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidestilata hingga mencapai volume 10 ml. Jumlah yang disuntikkan adalah 0,1 ml/10 g BB mencit.

$$\begin{aligned}\text{Untuk dosis } 6 \text{ mg/kgBB} &= 6/10 \times 12,27295 \text{ } \mu\text{l} \\ &= 7,36377 \text{ } \mu\text{l}\end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 10 ml larutan dosis 6 mg/kgB dengan cara mengambil 7,36377 μl larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidestilata hingga mencapai volume 10 ml. Jumlah yang disuntikkan adalah 0,1 ml/10 g BB mencit.

$$\begin{aligned}\text{Untuk dosis } 3 \text{ mg/kgBB} &= 3/10 \times 12,27295 \text{ } \mu\text{l} \\ &= 3,681885 \text{ } \mu\text{l}\end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 10 ml larutan dosis 3 mg/kgB dengan cara mengambil 3,681885 μl larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidestilata hingga mencapai volume 10 ml. Jumlah yang disuntikkan adalah 0,1 ml/10 g BB mencit.

Lampiran 2. Prosedur pembuatan preparat histopatologi ovarium

Langkah-langkah pembuatan preparat histopatologi ovarium:

1. Organ ovarium difiksasi dengan larutan Boin selama 24 jam
2. Langkah-langkah membuat sediaan:
 - a. Dehidrasi: bertujuan untuk menarik air dari jaringan. Jaringan dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, kemudian dimasukkan berturut-turut ke dalam alkohol 70% selama 2 jam, alkohol 80% selama 2 jam, alkohol 95% selama 2 jam, alkohol 96% selama 1 jam dan alkohol absolut selama 1 jam.
 - b. *Clearing* (penjernihan): bertujuan untuk menjernihkan karingan. Jaringan direndam dalam xylol I (1 jam), xylol II (2 jam), kemudian xylol III (2 jam)
 - c. Infiltrasi: jaringan dimasukkan dalam parafin I cair, kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam parafin II dan dimasukan ke dalam oven kembali selama 30 menit pada suhu 58-60°C.
 - d. *Embeding* (pengeblokan): bertujuan untuk melakukan pencetakan. Pencetakan dengan menggunakan parafin cair dan panas, dituangkan ke dalam cetakan besi berbentuk kubus. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam cetakan tersebut sebanyak mungkin. Cetakan dianginkan hingga parafin membeku.

3. Pengirisan jaringan: pemotongan diambil secara random dengan ketebalan 6 mikrometer. Selanjutnya dimasukkan ke dalam air hangat dengan suhu 20-30°C sampai jaringan mengembang. Cetakan diletakkan di gelas obyek yang telah diolesi putih telur dan dikeringkan di atas *hot plate* pada suhu 60°C.
4. Pewarnaan
 - a. Deparafinisasi: jaringan dimasukkan ke dalam xylol I (selama 5 menit) dan xylol II (selama 10 menit)
 - b. Hidrasi: dimasukkan ke dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 95% selama 2 menit dan alkohol 80% selama 2 menit.
 - c. Dicuci dengan air mengalir selama 10 menit, kemudian dimasukkan ke dalam mayer hematoksin selama 10 menit.
 - d. Dicuci lagi dengan air mengalir selama 20 menit, kemudian dimasukkan ke dalam eosin 1% selama 1 menit
 - e. Dehidrasi: preparat dimasukkan ke dalam alkohol 80% selama 2 menit dan alkohol 96% selama 2 menit dan dianginkan.
 - f. *Clearing*: direndam dengan xylol I selama 5 menit, xylol II selama 5 menit dan xylol III selama 5 menit.
 - g. Sediaan dibiarkan kering kemudian ditetesi dengan Canada Balsem yang dicampur dengan sodium karbonat, kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diberi label.
 - h. Setelah sediaan kering siap diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x, dilihat pada 5 lapangan pandang.

Lampiran 3. Prosedur pemeriksaan kadar estrogen darah dengan menggunakan metode Elisa

Langkah-langkah pemeriksaan hormon estrogen dengan metode Elisa:

1. Tandai masing-masing dinding tempat reaksi secara duplo (A s.d. F diisi dengan estradiol standar, selanjutnya diisi sampel kelompok kontrol, X1, X2 dan X3, dilanjutkan dengan estradiol standar, Qc-L dan Qc-H)
2. Masukkan 25 μ l larutan standar, sampel dan kontrol ke tempat yang sudah ditandai tadi.
3. Masukkan 100 μ l larutan estradiol-HRP terkonjugasi ke dalam masing-masing larutan tersebut.
4. Masukkan 50 μ l anti-estradiol kelinci ke dalam masing-masing campuran larutan tersebut.
5. Campurkan larutan di dalam masing-masing tabung selama 30 detik hingga tercampur sempurna.
6. Inkubasi di suhu ruangan (18-25°C) selama 90 menit.
7. Cuci dindingnya sebanyak 5 kali dengan *deionized water*.
8. Masukkan 100 μ l reagen TMB melalui masing-masing dindingnya, aduk selama 10 detik.
9. Inkubasi di dalam suhu ruangan (18-25°C) selama 20 menit.
10. Hentikan reaksi dengan menambahkan 100 μ l *stop solution* melalui dindingnya.
11. Campurkan selama 30 detik. Pastikan semua larutan berubah warna dari biru menjadi kuning.

12. Baca absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm dengan alat pembaca mikrotiter selama 15 menit.
13. Membuat grafik pada kertas yang telah disediakan.
14. Baca hasil kadar estrogen darah pada semua kelompok sampel.

Lampiran 4. Tabel data kasar jumlah folikel ovarium menciit

SAMPEL	KONTROL	K1	K2	K3
F.PRIMER				
1	145	72	30.5	126
2	115	114	58.5	55
3	75	102	52.5	24
4	90	126	55	53.5
5	120	60	46	40
6	125	120	43	44
7	105	60	69	60.5
8	65	61	105	27.5
9	100	84	50	75
TOTAL	940	799	509.5	505.5
RATA2	104.4444	88.77778	56.61111	56.16667
F. SEKUNDER				
1	123	72	47	46
2	177	42,5	52	21
3	87	137	86	40
4	65	72	43	25
5	72,5	100	33	72
6	59	82	53	61
7	70	55	48	87
8	35	69	15	57
9	76,5	86,5	21	93
TOTAL	765	716	398	502
RATA2	85	79,5556	44,2222	55,7778
F. TERSIER				
1	129	16	18	4
2	121	30	9	24,5
3	32	71	44	28
4	33,5	54	42	20
5	49,5	60	8	40
6	21	35,5	25	55,5
7	40	20	27	46
8	25	32	8	12
9	54,5	12	25	60
TOTAL	505,5	330,5	206	290
RATA2	56,1667	36,7222	22,8889	32,2222
F. DE GRAAF				
1	6	0	10	5
2	47	5	4	10,5
3	12	10,5	13	0
4	28,5	20	1	0
5	29,5	10	10	10
6	2,5	19,5	9	6
7	22	0	2	20
8	18	13	0	15
9	15	6	5	27
TOTAL	180,5	84	54	93,5
RATA2	20,0556	9,3333	6	10,3889

Lampiran 5. Tabel data kasar diameter folikel ovarium mencit (μm)

SAMPEL	KONTROL	K1	K2	K3
F.PRIMER				
1	4,725	2	3,5	4,92
2	3,92	4,585	4,68	4,97
3	4,035	5,615	4,6	0
4	4,585	3,84	5,065	1,5
5	4,54	4,67	5,105	4
6	4,835	4,415	6,75	4,25
7	4,335	2	4,515	4,165
8	2	2,5	3,29	2,5
9	5,415	1,835	4,54	4,585
TOTAL	38,39	31,46	42,045	30,89
RATA2	4,2656	3,4956	4,6717	3,4322
F. SEKUNDER				
1	10,77	12,83	11,065	10,145
2	10,415	12,31	8,885	12,44
3	9,015	10,005	10,66	12,4
4	10,09	9,265	14,945	11,69
5	9,035	10,65	13,685	9,83
6	8,325	8,94	12,79	11,54
7	8,63	13,27	10,7	9,39
8	8,215	12,515	5,385	9,355
9	9,75	8,415	8,29	9,665
TOTAL	84,245	98,2	96,405	96,455
RATA2	9,3606	10,9111	10,7117	10,7172
F. TERSIER				
1	16,475	17	10,39	15,43
2	14,55	20,45	20,875	21,135
3	21,625	14,32	17,075	17,86
4	17,62	18,385	18,25	8,5
5	17,41	22,83	14,75	18,345
6	16,75	20,95	23,26	15,765
7	16,59	18,25	18,365	17,655
8	12,09	19,215	8	16
9	14,135	7,625	15,56	14,17
TOTAL	147,245	159,025	146,525	144,86
RATA2	16,3606	17,6694	16,2806	16,0956
F. DE GRAAF				
1	11	0	12,3	16,85
2	17,34	18,25	15,25	24,835
3	8,5	12,665	33,285	0
4	21,385	25,61	8,5	0
5	22,155	18,5	26,69	24,375
6	10	25,67	13,28	16,75
7	20,615	0	12,75	26,25
8	21,585	25,75	0	18,5
9	19,125	14	12,8	22,25
TOTAL	151,705	140,445	134,855	149,81
RATA2	16,8501	15,605	14,9839	16,6456

Lampiran 6. Tabel data kasar kadar estrogen darah mencit (pg/ml)

NO	KELOMPOK				
	KONTROL	K1	K2	K3	
1		0	0	10	0
2		0	0	16	0
3		0	0	10	0
4		0	0	10	0
5		0	0	16	0
6		0	0	10	0
7		0	0	0	0
8		0	0	0	0
9		0	0	0	0
TOTAL		0	0	72	0
MEAN		0	0	8	0

Lampiran 7. Hasil uji normalitas jumlah folikel ovarium

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Perlakuan			Jumlah Folikel Primer	Jumlah Folikel Sekunder	Jumlah Folikel Tersier	Jumlah Folikel De Graaf
Kontrol	N		9	9	9	9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	104.4444	85.0000	56.1667	20.0556
		Std. Deviation	25.1799	41.7455	40.5008	13.6507
	Most Extreme Differences	Absolute	.107	.259	.294	.133
		Positive	.101	.259	.294	.133
		Negative	-.107	-.156	-.193	-.099
	Kolmogorov-Smirnov Z		.321	.776	.883	.400
	Asymp. Sig. (2-tailed)		1.000	.584	.417	.997
P1 (3 mg/kgBB)	N		9	9	9	9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	88.7778	79.5556	36.7222	9.3333
		Std. Deviation	27.1651	27.3261	20.6293	7.3866
	Most Extreme Differences	Absolute	.180	.177	.190	.138
		Positive	.180	.177	.190	.119
		Negative	-.157	-.127	-.132	-.138
	Kolmogorov-Smirnov Z		.540	.532	.571	.414
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.932	.939	.900	.996
P2 (6 mg/kgBB)	N		9	9	9	9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	56.6111	44.2222	22.8889	6.0000
		Std. Deviation	21.0398	20.6929	13.6789	4.6368
	Most Extreme Differences	Absolute	.242	.225	.178	.186
		Positive	.242	.225	.178	.141
		Negative	-.148	-.143	-.141	-.186
	Kolmogorov-Smirnov Z		.726	.674	.535	.557
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.668	.754	.937	.916
P3 (12 mg/kgBB)	N		9	9	9	9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	56.1667	55.7778	32.2222	10.3889
		Std. Deviation	30.6686	25.3810	19.3522	9.0408
	Most Extreme Differences	Absolute	.222	.113	.142	.162
		Positive	.222	.110	.142	.162
		Negative	-.147	-.113	-.108	-.125
	Kolmogorov-Smirnov Z		.665	.339	.426	.485
	Asymp. Sig. (2-tailed)		.769	1.000	.993	.973

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 8. Hasil uji normalitas diameter folikel ovarium

NPar Tests

Perlakuan = Kontrol

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter Folikel Primer	Diameter Folikel Sekunder	Diameter Folikel Tersier	Diameter Folikel De Graaf
N		9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4.2656	9.3606	16.3606	16.8561
	Std. Deviation	.9581	.9305	2.6713	5.4953
Most Extreme Differences	Absolute	.248	.192	.208	.216
	Positive	.165	.192	.208	.190
	Negative	-.248	-.117	-.184	-.216
Kolmogorov-Smirnov Z		.744	.577	.623	.647
Asymp. Sig. (2-tailed)		.637	.893	.833	.796

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan = Kontrol

Perlakuan = P1 (3 mg/kgBB)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter Folikel Primer	Diameter Folikel Sekunder	Diameter Folikel Tersier	Diameter Folikel De Graaf
N		9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.4956	10.9111	17.6694	15.6050
	Std. Deviation	1.7408	1.8537	4.4850	10.1116
Most Extreme Differences	Absolute	.245	.219	.218	.172
	Positive	.139	.146	.125	.161
	Negative	-.245	-.219	-.218	-.172
Kolmogorov-Smirnov Z		.735	.658	.655	.516
Asymp. Sig. (2-tailed)		.652	.780	.784	.953

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan = P1 (3 mg/kgBB)

Perlakuan = P2 (6 mg/kgBB)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter Folikel Primer	Diameter Folikel Sekunder	Diameter Folikel Tersier	Diameter Folikel De Graaf
N		9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	4.6717	10.7117	16.2806	14.9839
	Std. Deviation	.9994	2.9322	4.8063	9.7369
Most Extreme Differences	Absolute	.221	.160	.153	.267
	Positive	.221	.119	.112	.267
	Negative	-.215	-.160	-.153	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		.664	.479	.459	.801
Asymp. Sig. (2-tailed)		.771	.976	.985	.543

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan = P2 (6 mg/kgBB)

Perlakuan = P3 (12 mg/kgBB)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter Folikel Primer	Diameter Folikel Sekunder	Diameter Folikel Tersier	Diameter Folikel De Graaf
N		9	9	9	9
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.4322	10.7172	16.0956	16.6456
	Std. Deviation	1.7255	1.2875	3.4993	10.0505
Most Extreme Differences	Absolute	.296	.227	.202	.282
	Positive	.186	.227	.149	.173
	Negative	-.296	-.183	-.202	-.282
Kolmogorov-Smirnov Z		.887	.682	.607	.846
Asymp. Sig. (2-tailed)		.411	.742	.855	.472

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Perlakuan = P3 (12 mg/kgBB)

Lampiran 9. Hasil uji normalitas kadar estrogen darah

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Perlakuan			Kadar Estrogen Darah
Kontrol	N		9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00
		Std. Deviation	.00 ^c
P1 (3 mg/kgBB)	N		9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00
		Std. Deviation	.00 ^c
P2 (6 mg/kgBB)	N		9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8.00
		Std. Deviation	6.48
	Most Extreme Differences	Absolute	.288
		Positive	.225
		Negative	-.288
	Kolmogorov-Smirnov Z		.864
Asymp. Sig. (2-tailed)		.445	
P3 (12 mg/kgBB)	N		9
	Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.00
		Std. Deviation	.00 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. The distribution has no variance for this variable. One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test cannot be performed.

Lampiran 10. Hasil uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah Folikel Primer	.610	3	32	.613
Jumlah Folikel Sekunder	.942	3	32	.432
Jumlah Folikel Tersier	3.069	3	32	.042
Jumlah Folikel De Graaf	2.304	3	32	.096

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Diameter Folikel Primer	2.462	3	32	.080
Diameter Folikel Sekunder	2.887	3	32	.051
Diameter Folikel Tersier	.868	3	32	.468
Diameter Folikel De Graaf	.611	3	32	.613

Lampiran 11. Hasil uji Anava satu arah untuk jumlah folikel ovarium

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Jumlah Folikel Primer	Kontrol	9	104.4444	25.1799	8.3933	85.0895	123.7994	65.00	145.00
	P1 (3 mg/kgBB)	9	88.7778	27.1651	9.0550	67.8968	109.6587	60.00	126.00
	P2 (6 mg/kgBB)	9	56.6111	21.0398	7.0133	40.4385	72.7837	30.50	105.00
	P3 (12 mg/kgBB)	9	56.1667	30.6686	10.2229	32.5927	79.7406	24.00	126.00
	Total	36	76.5000	32.8231	5.4705	65.3943	87.6057	24.00	145.00
Jumlah Folikel Sekunder	Kontrol	9	85.0000	41.7455	13.9152	52.9116	117.0884	35.00	177.00
	P1 (3 mg/kgBB)	9	79.5556	27.3261	9.1087	58.5509	100.5602	42.50	137.00
	P2 (6 mg/kgBB)	9	44.2222	20.6929	6.8976	28.3163	60.1282	15.00	86.00
	P3 (12 mg/kgBB)	9	55.7778	25.3810	8.4603	36.2682	75.2873	21.00	93.00
	Total	36	66.1389	33.2116	5.5353	54.9017	77.3761	15.00	177.00
Jumlah Folikel Tersier	Kontrol	9	56.1667	40.5008	13.5003	25.0350	87.2983	21.00	129.00
	P1 (3 mg/kgBB)	9	36.7222	20.6293	6.8764	20.8651	52.5793	12.00	71.00
	P2 (6 mg/kgBB)	9	22.8889	13.6789	4.5596	12.3744	33.4034	8.00	44.00
	P3 (12 mg/kgBB)	9	32.2222	19.3522	6.4507	17.3468	47.0976	4.00	60.00
	Total	36	37.0000	27.4250	4.5708	27.7207	46.2793	4.00	129.00
Jumlah Folikel De Graaf	Kontrol	9	20.0556	13.6507	4.5502	9.5627	30.5484	2.50	47.00
	P1 (3 mg/kgBB)	9	9.3333	7.3866	2.4622	3.6555	15.0112	.00	20.00
	P2 (6 mg/kgBB)	9	6.0000	4.6368	1.5456	2.4358	9.5642	.00	13.00
	P3 (12 mg/kgBB)	9	10.3889	9.0408	3.0136	3.4395	17.3383	.00	27.00
	Total	36	11.4444	10.3336	1.7223	7.9481	14.9408	.00	47.00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Jumlah Folikel Primer	Between Groups	15665.833	3	5221.944	7.581	.001
	Within Groups	22041.667	32	688.802		
	Total	37707.500	35			
Jumlah Folikel Sekunder	Between Groups	10110.972	3	3370.324	3.785	.020
	Within Groups	28494.333	32	890.448		
	Total	38605.306	35			
Jumlah Folikel Tersier	Between Groups	5304.500	3	1768.167	2.692	.063
	Within Groups	21020.000	32	656.875		
	Total	26324.500	35			
Jumlah Folikel De Graaf	Between Groups	984.278	3	328.093	3.813	.019
	Within Groups	2753.111	32	86.035		
	Total	3737.389	35			

Lampiran 12. Hasil uji Anava satu arah untuk diameter folikel ovarium

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Diameter Folikel Primer	Kontrol	9	4.2656	.9581	.3194	3.5291	5.0020	2.00	5.42
	P1 (3 mg/kgBB)	9	3.4956	1.7408	.5803	2.1574	4.8337	.00	5.62
	P2 (6 mg/kgBB)	9	4.6717	.9994	.3331	3.9034	5.4399	3.29	6.75
	P3 (12 mg/kgBB)	9	3.4322	1.7255	.5752	2.1059	4.7585	.00	4.97
	Total	36	3.9663	1.4466	.2411	3.4768	4.4557	.00	6.75
Diameter Folikel Sekunder	Kontrol	9	9.3606	.9305	.3102	8.6453	10.0758	8.22	10.77
	P1 (3 mg/kgBB)	9	10.9111	1.8537	.6179	9.4862	12.3360	8.41	13.27
	P2 (6 mg/kgBB)	9	10.7117	2.9322	.9774	8.4578	12.9656	5.39	14.95
	P3 (12 mg/kgBB)	9	10.7172	1.2875	.4292	9.7275	11.7069	9.36	12.44
	Total	36	10.4251	1.9294	.3216	9.7723	11.0780	5.39	14.95
Diameter Folikel Tersier	Kontrol	9	16.3806	2.6713	.8904	14.3072	18.4139	12.09	21.63
	P1 (3 mg/kgBB)	9	17.6694	4.4850	1.4950	14.2220	21.1169	7.63	22.83
	P2 (6 mg/kgBB)	9	16.2806	4.8063	1.6021	12.5861	19.9750	8.00	23.26
	P3 (12 mg/kgBB)	9	16.0956	3.4993	1.1664	13.4057	18.7854	8.50	21.14
	Total	36	16.6015	3.8352	.6392	15.3039	17.8992	7.63	23.26
Diameter Folikel De Graaf	Kontrol	9	16.8561	5.4953	1.8318	12.6320	21.0802	8.50	22.16
	P1 (3 mg/kgBB)	9	15.6050	10.1116	3.3705	7.8325	23.3775	.00	25.75
	P2 (6 mg/kgBB)	9	14.9839	9.7369	3.2456	7.4994	22.4683	.00	33.28
	P3 (12 mg/kgBB)	9	16.6456	10.0505	3.3502	8.9200	24.3711	.00	26.25
	Total	36	16.0226	8.6967	1.4494	13.0801	18.9652	.00	33.28

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Diameter Folikel Primer	Between Groups	9.845	3	3.282	1.657	.196
	Within Groups	63.397	32	1.981		
	Total	73.242	35			
Diameter Folikel Sekunder	Between Groups	13.832	3	4.611	1.267	.302
	Within Groups	116.462	32	3.639		
	Total	130.294	35			
Diameter Folikel Tersier	Between Groups	14.018	3	4.673	.299	.826
	Within Groups	500.776	32	15.649		
	Total	514.794	35			
Diameter Folikel De Graaf	Between Groups	21.025	3	7.008	.085	.968
	Within Groups	2626.107	32	82.066		
	Total	2647.132	35			

Lampiran 13. Hasil uji BNT jumlah folikel ovarium pada berbagai kelompok perlakuan

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Jumlah Folikel Primer	Kontrol	P1 (3 mg/kgBB)	15.6667	12.3720	.215	-9.5343	40.8677
		P2 (6 mg/kgBB)	47.8333*	12.3720	.001	22.6323	73.0343
		P3 (12 mg/kgBB)	48.2778*	12.3720	.000	23.0768	73.4788
	P1 (3 mg/kgBB)	Kontrol	-15.6667	12.3720	.215	-40.8677	9.5343
		P2 (6 mg/kgBB)	32.1667*	12.3720	.014	6.9657	57.3677
		P3 (12 mg/kgBB)	32.6111*	12.3720	.013	7.4101	57.8121
	P2 (6 mg/kgBB)	Kontrol	-47.8333*	12.3720	.001	-73.0343	-22.6323
		P1 (3 mg/kgBB)	-32.1667*	12.3720	.014	-57.3677	-6.9657
		P3 (12 mg/kgBB)	.4444	12.3720	.972	-24.7566	25.6454
	P3 (12 mg/kgBB)	Kontrol	-48.2778*	12.3720	.000	-73.4788	-23.0768
		P1 (3 mg/kgBB)	-32.6111*	12.3720	.013	-57.8121	-7.4101
		P2 (6 mg/kgBB)	-.4444	12.3720	.972	-25.6454	24.7566
Jumlah Folikel Sekunder	Kontrol	P1 (3 mg/kgBB)	5.4444	14.0669	.701	-23.2089	34.0978
		P2 (6 mg/kgBB)	40.7778*	14.0669	.007	12.1245	69.4311
		P3 (12 mg/kgBB)	29.2222*	14.0669	.046	.5689	57.8755
	P1 (3 mg/kgBB)	Kontrol	-5.4444	14.0669	.701	-34.0978	23.2089
		P2 (6 mg/kgBB)	35.3333*	14.0669	.017	6.6800	63.9866
		P3 (12 mg/kgBB)	23.7778	14.0669	.101	-4.8755	52.4311
	P2 (6 mg/kgBB)	Kontrol	-40.7778*	14.0669	.007	-69.4311	-12.1245
		P1 (3 mg/kgBB)	-35.3333*	14.0669	.017	-63.9866	-6.6800
		P3 (12 mg/kgBB)	-11.5556	14.0669	.417	-40.2089	17.0978
	P3 (12 mg/kgBB)	Kontrol	-29.2222*	14.0669	.046	-57.8755	-.5689
		P1 (3 mg/kgBB)	-23.7778	14.0669	.101	-52.4311	4.8755
		P2 (6 mg/kgBB)	11.5556	14.0669	.417	-17.0978	40.2089
Jumlah Folikel De Graaf	Kontrol	P1 (3 mg/kgBB)	10.7222*	4.3725	.020	1.8157	19.6287
		P2 (6 mg/kgBB)	14.0556*	4.3725	.003	5.1490	22.9621
		P3 (12 mg/kgBB)	9.6667*	4.3725	.034	.7602	18.5732
	P1 (3 mg/kgBB)	Kontrol	-10.7222*	4.3725	.020	-19.6287	-1.8157
		P2 (6 mg/kgBB)	3.3333	4.3725	.451	-5.5732	12.2398
		P3 (12 mg/kgBB)	-1.0556	4.3725	.811	-9.9621	7.8510
	P2 (6 mg/kgBB)	Kontrol	-14.0556*	4.3725	.003	-22.9621	-5.1490
		P1 (3 mg/kgBB)	-3.3333	4.3725	.451	-12.2398	5.5732
		P3 (12 mg/kgBB)	-4.3889	4.3725	.323	-13.2954	4.5176
	P3 (12 mg/kgBB)	Kontrol	-9.6667*	4.3725	.034	-18.5732	-.7602
		P1 (3 mg/kgBB)	1.0556	4.3725	.811	-7.8510	9.9621
		P2 (6 mg/kgBB)	4.3889	4.3725	.323	-4.5176	13.2954

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

Lampiran 14. Hasil uji korelasi Pearson

Correlations

Correlations

Perlakuan			Jumlah Folikel Primer	Jumlah Folikel Sekunder	Jumlah Folikel Tersier	Jumlah Folikel De Graaf
Kontrol	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9
P1 (3 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9
P2 (6 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	.189	.434	-.121	.507
		Sig. (2-tailed)	.626	.243	.756	.163
		N	9	9	9	9
P3 (12 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

Correlations

Correlations

Perlakuan			Diameter Folikel Primer	Diameter Folikel Sekunder	Diameter Folikel Tersier	Diameter Folikel De Graaf
Kontrol	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9
P1 (3 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9
P2 (6 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	.373	.556	.351	.527
		Sig. (2-tailed)	.322	.120	.354	.145
		N	9	9	9	9
P3 (12 mg/kgBB)	Kadar Estrogen Darah	Pearson Correlation	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a
		Sig. (2-tailed)
		N	9	9	9	9

a. Cannot be computed because at least one of the variables is constant.

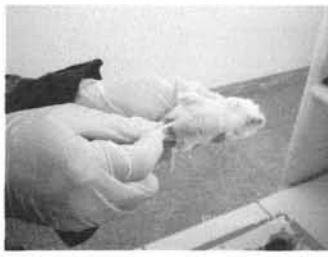
Lampiran 15. Tabel konversi dosis (Kusumawati, 2004)

	MENCIT (20 g)	TIKUS (200 g)	MARMUT (400 g)	KELINCI (1,5 kg)	KUCING (2 kg)	KERA (4 kg)	ANJING (12 kg)	MANUSIA (70 kg)
MENCIT (20 g)	1,0	7,0	2,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
TIKUS (200 g)	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
MARMUT (400 g)	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
KELINCI (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
KUCING (2 kg)	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
KERA (4 kg)	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
ANJING (12 kg)	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
MANUSIA (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

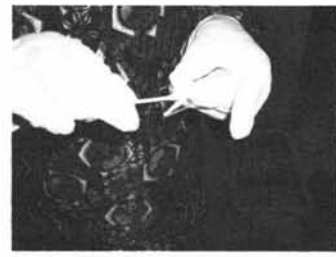
Lampuran 16. Pelaksanaan penelitian



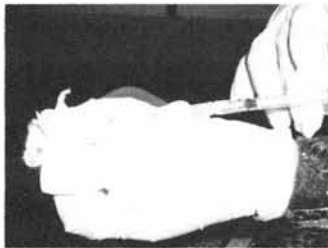
1. Membagi sampel menjadi 4 kelompok



2. Swab vagina untuk mendapatkan fase diestrus sebagai awal perlakuan



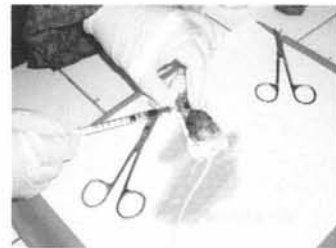
3. Membuat apusan vagina



4. Mencit yang berada fase diestrus diinjeksi dengan nikotin subkutan



5. Pengorbanan dilakukan setelah tujuh hari perlakuan



6. Mengambil sampel darah untuk pemeriksaan kadar estrogen darah



7. Pemeriksaan Elisa untuk mengetahui kadar estrogen darah

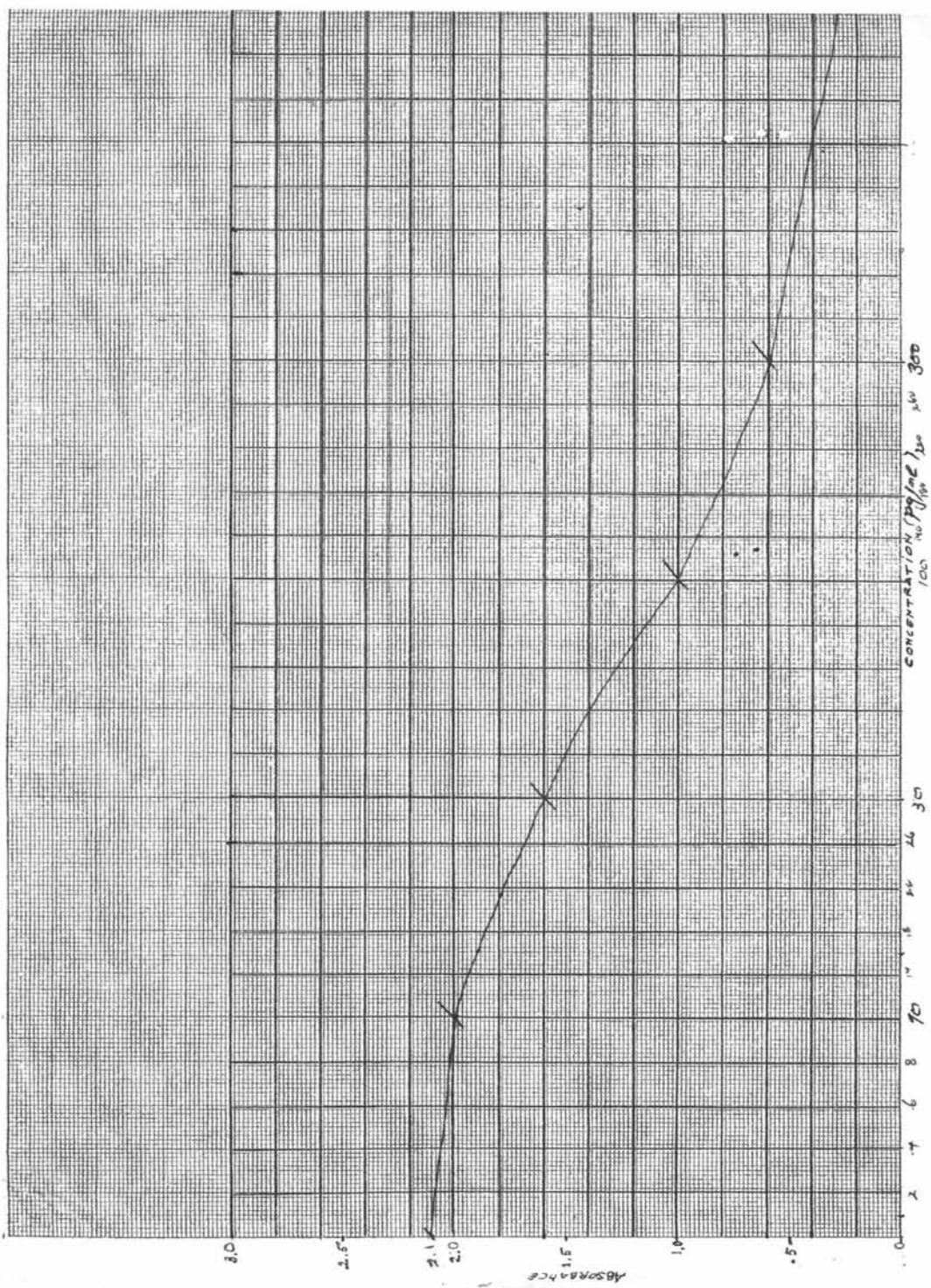


8. Pengambilan organ ovarium



9. Pemeriksaan histopatologi ovarium

Lampiran 17. Kurva hasil pemeriksaan Elisa untuk kadar estrogen darah



Lampiran 18. Surat laik etik



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 19/EC/KEPK/FKUA/2010

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Efek Nikotin Terhadap Folikulogenesis dan Kadar Estrogen Darah
pada Mencit (Mus Musculus)**

PENELITI UTAMA :

Meitria Syahadatina Noor, dr (NIM: 090810208/M)

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Laboratorium Invitro Fakuatas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga,
Laboratorium Biologi Fakultas Sain dan Teknologi Univeristas Airlangga, dan
Laboratorium Kebidanan Fakuatas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Surabaya, 26 Mei 2010



[Handwritten Signature]
Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS