

FERTILISASI *IN VITRO*  
IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

NIKOTINE

KK  
KKA  
TKR- 05/11  
Sum  
P

## TESIS

# PENGARUH NIKOTIN TERHADAP KADAR MALONILDIALDEHID ( MDA ) SERUM DAN KEBERHASILAN FERTILISASI *IN VITRO* PADA TIKUS PUTIH ( *Rattus novergicus* )



**SUMIATI**  
**NIM. 090810546M**



**PROGRAM PASCASARJANA**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**  
**2010**

**PENGARUH NIKOTIN TERHADAP KADAR MALONILDIALDEHID  
( MDA ) SERUM DAN KEBERHASILAN FERTILISASI *IN VITRO*  
PADA TIKUS PUTIH ( *Rattus novergius* )**

**TESIS**

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

**Oleh :**

**SUMIATI  
NIM. 090810546M**

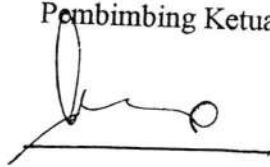
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL *12.8.2010*.....

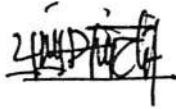
Oleh

Pembimbing Ketua,



Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp. OG. (K)  
NIP. 140 207 243

Pembimbing,



Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes  
NIP. 19650522 199702 1 001

Mengetahui  
Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi



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

Telah diuji pada  
Tanggal.....

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Prof. Dr. Agus Abadi, dr., Sp.OG. (K).
- Anggota : 1. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG. (K).
2. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes.
3. Dr. Rina Judiwati, dr., MS.
4. Dr. Widjiati, drh., M.Si.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat-Nya sehingga tesis ini dapat selesai. Terima kasih yang setinggi-tingginya diucapkan untuk Dr. Hendy Hendaro, dr., Sp.OG. (K). sebagai pembimbing ketua dan Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes. sebagai pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan saran selama penulisan tesis ini.

Perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga (Prof. Dr. H. Fasich, Apt.) atas kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga (Prof. Dr. Ciptohadi S.) 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 kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi FK Unair.
4. Ketua TKPSM Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjadi mahasiswa Program Magister di Unair.
5. Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Unair, Prof. Dr. Erry Gumilar Dachlan, dr., Sp.OG. (K), atas segala masukan selama ini sehingga tesis ini dapat diselesaikan tepat waktu.
6. Rektor Universitas Adi Buana Surabaya Bapak Drs. H. Sutijono, MM atas segala dukungannya selama mengikuti pendidikan pada program pasca sarjana FK Unair.
7. Dr. Widjiati, drh., M.Si. atas semua bantuan dan bimbingan selama melaksanakan penelitian.
8. Tim penguji tesis atas segala masukannya.
9. Tim Laboratorium Invitro FKH Unair yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.
10. Suami dan anak-anak atas segala motivasi dan support selama studi.
11. Teman-teman IKR 2008: Yayuk, Iis, Win, Lestari, Henny, Meitria dan Dina atas kerjasamanya selama ini. Khususnya kepada Meitria atas semua bantuan yang telah diberikan.
12. Semua pihak yang telah banyak membantu studi saya hingga tesis ini selesai, yang namanya tidak dapat disebutkan satu-persatu

Saya memohon maaf kepada semua pihak atas segala kekurangan dan kesalahan yang pernah saya perbuat.

Surabaya, Juli 2010

Sumiati

## RINGKASAN

**PENGARUH NIKOTIN TERHADAP KADAR MALONILDIALDEHID (MDA) SERUM DAN KEBERHASILAN FERTILISASI *IN VITRO* PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)**

Indonesia adalah salah satu negara konsumen tembakau terbesar di dunia dan menempati urutan ketiga diantara negara-negara dengan tingkat agregat konsumsi tembakau tertinggi di dunia. Salah satu kandungan tembakau adalah nikotin. Nikotin diserap dengan cepat ketika asap rokok masuk ke saluran pernafasan, konsentrasi nikotin dalam darah akan meningkat cepat. Sekitar 1 mg nikotin (rata-rata 0,3 – 2 mg) diserap secara sistemik selama merokok. Absorpsi nikotin dari lingkungan yang terisap perokok pasif bisa mencapai 60 hingga 80%. Nikotin diserap 80 – 90% pada perokok aktif. Nikotin akan masuk ke sirkulasi darah pada pH 7,4 setelah diserap.

Nikotin memiliki sifat pro-oksidan, yaitu menyebabkan reaksi oksidatif di dalam sel (terjadi stres oksidatif). Kondisi ini terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara antioksidan dengan proses pro-oksidan di dalam sel darah, plasma darah dan jaringan. Stres oksidatif akan menyebabkan terjadinya proses peroksidasi lipid dengan produk yang dihasilkan adalah MDA, jika terjadi terus-menerus maka timbullah akumulasi stres oksidatif yang akan merusak mitokondria dan DNA. Rusaknya DNA akan mempengaruhi banyak sel di dalam tubuh, termasuk oosit. Kerusakan DNA pada oosit akan menyebabkan kelainan ekspresi gen, salah satunya ekspresi gen pada zona pelusida.

Kelainan ekspresi gen pada zona pelusida menyebabkan komponennya tidak bisa diakses oleh sperma karena tidak dapat mengenali sperma dan reseptornya tidak dapat berikatan dengan sperma, sehingga tidak terjadi fertilisasi, dengan demikian adanya nikotin menyebabkan zona pelusida tidak dapat mengenali sperma dan reseptornya tidak mampu mengikat sperma sehingga tidak terjadi fertilisasi dan tidak ditemukan adanya gambaran badan polar II.

Penelitian ini untuk mempelajari pengaruh nikotin terhadap kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Rattus novergicus*. Rancangan penelitian ini adalah eksperimental dengan *post test only control group design*. Subjek penelitian terdiri dari 4 kelompok (36 ekor tikus) yang dipilih secara acak dan homogen. Kelompok penelitian terdiri dari kelompok kontrol (K0), kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 7 hari dengan dosis 70 mg/Kg BB (K1), 52,5 mg/kgBB (K2) dan 35 mg/kgBB (K3). Hasil yang diamati adalah adanya badan polar II/sigot 2 sel.

Rerata jumlah sel telur yang didapatkan adalah 9,778 untuk K0, 2,222 untuk K1, 3,333 untuk K2, dan 5,555 untuk K3. Rerata kadar MDA serum adalah 2,865 nmol (K0), 6,642 nmol (K1), 4,454 nmol (K2), 4,313 nmol (K3). Keberhasilan fertilisasi untuk seluruh telur yang dilakukan IVF adalah 100% berhasil.

Semua data berada dalam distribusi normal dan homogen, sehingga dilakukan uji *one way Anova* pada taraf kepercayaan 95%. Hasil uji *one way Anova* untuk mengetahui perbedaan kadar MDA serum adalah terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji BNT. Hasil uji BNT kadar MDA serum adalah terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara K1 dan K0, K1 dan K2, K1 dan K3 serta K2 dan K0. Angka keberhasilan fertilisasi tidak dapat dilakukan uji statistik karena seluruh data 100% berhasil. Dengan demikian tidak dapat dilakukan uji hubungan antara kadar MDA serum dengan angka keberhasilan fertilisasi.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa nikotin dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA serum. Penelitian ini tidak dapat membuktikan pengaruh nikotin terhadap angka keberhasilan fertilisasi, sehingga tidak dapat menghubungkan antara kadar MDA serum dengan angka keberhasilan fertilisasi. Saran yang diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah perlunya penambahan jumlah hewan coba dan lama paparan nikotin terhadap hewan coba untuk mengetahui efek nikotin terhadap kerusakan DNA dan zona pelusida oosit.

## SUMMARY

### EFFECT OF NICOTINE ON SERUM MALONILDIALDEHYDE (MDA) CONCENTRATION AND THE SUCCESS OF IN VITRO FERTILIZATION IN *Rattus norvegicus*

Indonesia is one of large tobacco-consumer countries in the world, holding the third position among countries with highest aggregate level of tobacco consumption worldwide. One of the ingredients in the tobacco is nicotine. Nicotine is absorbed rapidly when the cigarette smoke is inhaled into respiratory tract. Blood nicotine concentration will be increasing promptly. Approximately 1 mg nicotine (averagely 0.3 - 2 mg) is absorbed systematically during cigarette smoking. Nicotine absorbed passively from the environment may reach 60 to 80%, while in active smoker the absorption will be 80 - 90%. Nicotine will enter blood circulation in pH 7.4 after being absorbed.

Nicotine has pro-oxidant characteristic, which is inducing oxidative reaction within cells, leading to the occurrence of oxidative stress. Such condition occurs due to the imbalance between antioxidant and pro-oxidant process in blood cells, blood plasma and tissue. Oxidative stress may cause lipid peroxidation process, which produces MDA. If it occurs continuously, oxidative stress accumulation will take place, which may damage mitochondria and DNA. DNA damage may affect various cells in the body, including oocytes. DNA damage in oocytes may induce gene expression abnormality, one of which is gene expression in zona pellucida.

Gene expression abnormality in zona pellucida makes its components cannot be accessed by sperms since it cannot recognize the sperm and its receptor cannot be bound to the sperm, preventing the occurrence of fertilization. Therefore, the presence of nicotine may make zona pellucida unable to recognize sperm and its receptor cannot bind sperm, preventing the fertilization and the absence of polar body II.

This research was aimed to study the effect of nicotine on serum MDA concentration and the success of in vitro fertilization in *Rattus norvegicus*. This was an experimental study using post test only control group design. Subjects comprised 4 groups (36 rats) selected randomly and homogeneous. The groups consisted of control group (K0), treatment group receiving subcutaneous nicotine injection for 7 days in doses of 70 mg/Kg BW (K1), 52.5 mg/kgBW (K2) and 35 mg/kgBW (K3). The result would be observed was the presence of polar body II/2-cell zygote.

The mean of oocytes obtained was 9.778 for K0, 2.222 for K1, 3.333 for K2, and 5.555 for K3. The mean of serum MDA concentration was 2.865



nmol (K0), 6.642 nmol (K1), 4.454 nmol (K2), and 4.313 nmol (K3). The success of fertilization for all oocytes after IVF was 100% success.

All data had normal distribution and were homogeneous, so that they were subjected to one-way Anova test with significance level of 95%. The result of one-way Anova was to identify the difference in serum MDA concentration. The serum MDA concentration was found to have statistically significant difference ( $p < 0.05$ ), so that it was followed by LSD test. LSD test to serum MDA concentration revealed significant difference ( $p < 0.05$ ) between K1 and K0, groups K1 and K2, K1 and K3, as well as K2 and K0. Fertilization success rate cannot be subjected to statistical test since all data were 100% successful. Therefore, correlation test between serum MDA concentration and fertilization success rate cannot be performed.

The result of this study showed that nicotine may increase serum MDA concentration. However, this study could not prove the effect of nicotine on fertilization success rate, so that it could not relate serum MDA concentration and fertilization success rate. It is suggested to increase the number of experimental animals and the length of nicotine exposure on those animals to find the effect of nicotine on DNA damage and oocyte zona pellucida.

## ABSTRAK

**PENGARUH NIKOTIN TERHADAP KADAR MALONILDIALDEHID (MDA) SERUM DAN KEBERHASILAN FERTILISASI *IN VITRO* PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)**

Indonesia adalah salah satu negara konsumen tembakau terbesar di dunia dan menempati urutan ketiga diantara negara-negara dengan tingkat agregat konsumsi tembakau tertinggi di dunia. Salah satu kandungan tembakau adalah nikotin. Nikotin bersifat pro-oksidan. Stres oksidatif akan menyebabkan peroksidasi lipid dengan produk yang dihasilkan adalah MDA, jika terjadi terus-menerus maka akan merusak mitokondria dan DNA. Kerusakan DNA pada oosit akan menyebabkan kelainan ekspresi gen zona pelusida. Kelainan ekspresi gen zona pelusida menyebabkan komponennya tidak bisa diakses oleh sperma sehingga tidak terjadi fertilisasi.

Penelitian ini untuk mempelajari pengaruh nikotin terhadap kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus*. Rancangan penelitian ini adalah eksperimental dengan *post test only control group design*. Subjek penelitian terdiri dari 4 kelompok (36 ekor tikus) yang dipilih secara acak dan homogen. Kelompok penelitian terdiri dari kelompok kontrol (K0), kelompok perlakuan yang diberikan injeksi nikotin subkutan selama 7 hari dengan dosis 70 mg/Kg BB (K1), 52,5 mg/kgBB (K2) dan 35 mg/kgBB (K3). Hasil yang diamati adalah adanya badan polar II/sigot 2 sel.

Hasil uji *one way* Anova adalah terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji BNT. Hasil uji BNT kadar MDA serum adalah terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) antara K1 dan K0, K1 dan K2, K1 dan K3 serta K2 dan K0. Angka keberhasilan fertilisasi tidak dapat dilakukan uji statistik karena seluruh data menunjukkan 100% berhasil. Dengan demikian tidak dapat dilakukan uji hubungan antara kadar MDA serum dengan angka keberhasilan fertilisasi.

Kesimpulan penelitian ini adalah nikotin dapat menyebabkan peningkatan kadar MDA serum tapi belum dapat mempengaruhi fertilisasi sehingga sehingga tidak dapat menghubungkan antara kadar MDA serum dengan angka keberhasilan fertilisasi.

Kata kunci: nikotin, kadar MDA serum, angka keberhasilan fertilisasi.

## ABSTRACT

**EFFECT OF NICOTINE ON SERUM MALONILDIALDEHYDE  
(MDA) CONCENTRATION AND THE SUCCESS OF IN VITRO  
FERTILIZATION  
IN *Rattus norvegicus***

Indonesia is one of large tobacco-consumer countries in the world, holding the third position among countries with highest aggregate level of tobacco consumption worldwide. One of the ingredients in the tobacco is nicotine. Nicotine has pro-oxidant characteristic. Oxidative stress may cause lipid peroxidation process, which produces MDA. If it occurs continuously, it will damage mitochondria and DNA. DNA damage in oocytes may induce gene expression abnormality in zona pellucida. Gene expression abnormality in zona pellucida makes its components cannot be accessed by sperms since it cannot recognize the sperm, preventing the occurrence of fertilization.

This research was aimed to study the effect of nicotine on serum MDA concentration and the success of in vitro fertilization in *Rattus norvegicus*. This was an experimental study using post test only control group design. Subjects comprised 4 groups (36 rats) selected randomly and homogeneous. The groups consisted of control group (K0), treatment group receiving subcutaneous nicotine injection for 7 days in doses of 70 mg/Kg BW (K1), 52.5 mg/kgBW (K2) and 35 mg/kgBW (K3). The result would be observed was the presence of polar body II/2-cell zygote.

The result of one-way Anova was found to have statistically significant difference ( $p < 0.05$ ), so that it was followed by LSD test. LSD test to serum MDA concentration revealed significant difference ( $p < 0.05$ ) between K1 and K0, groups K1 and K2, K1 and K3, as well as K2 and K0. Fertilization success rate cannot be subjected to statistical test since all data were 100% successful. Therefore, correlation test between serum MDA concentration and fertilization success rate cannot be performed.

In conclusion, nicotine can increase serum MDA concentration, yet unable to affect fertilization, so that serum MDA concentration cannot be correlated with fertilization success rate.

**Keywords:** nicotine, serum MDA concentration, fertilization success rate



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan .....	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan .....	vii
<i>Summary</i> .....	ix
Abstrak .....	xi
<i>Abstrack</i> .....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat akademis.....	5
1.4.2 Manfaat praktis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Nikotin.....	6
2.2 Sel Telur.....	9
2.3 Spermatozoa.....	10
2.4 Fertilisasi.....	12
2.5 Efek Nikotin terhadap Reaksi Oksidatif dan Fertilisasi.....	17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	23
3.1 Kerangka Konseptual.....	23
3.2 Hipotesis Penelitian.....	25
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	26
4.1 Rancangan Penelitian.....	26
4.2 Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	27
4.3 Variabel Penelitian.....	28
4.3.1 Klasifikasi variabel.....	28

4.3.2 Definisi operasional variabel.....	28
4.4 Bahan Penelitian.....	29
4.5 Instrumen Penelitian.....	29
4.6 Lokasi dan Waktu penelitian.....	29
4.7 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data.....	29
4.7.1 Pembuatan larutan nikotin.....	29
4.7.2 Perlakuan dan pengamatan.....	30
4.7.3 Kerangka operasional.....	32
4.8 Cara Pengolahan dan Analisis Data.....	33
<b>BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
5.1 Data Penelitian.....	34
5.2 Analisis dan Hasil Penelitian.....	35
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas.....	36
5.2.2 Hasil Uji Anova Satu Arah.....	37
5.2.3 Hasil Uji Beda Nyata Terkecil/BNT ( <i>Post Hoc Test</i> ).....	38
5.2.4 Uji Homogenitas Subset.....	40
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>	<b>41</b>
6.1 Efek Nikotin terhadap Kadar MDA Serum.....	41
6.2 Efek Nikotin terhadap Keberhasilan Fertilisasi <i>In vitro</i> .....	43
6.3 Hubungan Kadar MDA Serum terhadap Keberhasilan Fertilisasi <i>In vitro</i> .....	44
<b>BAB 7 PENUTUP.....</b>	<b>47</b>
7.1 Kesimpulan.....	47
7.2 Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>51</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 : Definisi operasional variabel.....	28
Tabel 5.1 : Rerata kadar MDA serum <i>Rattus novergicus</i> .....	35
Tabel 5.2 : Rerata jumlah sel telur yang diovulasikan dan keberhasilan fertilisasi <i>Rattus novergicus</i> .....	36

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur molekul nikotin.....	6
Gambar 2.2 : Sel telur <i>Rattus novergicus</i> .....	9
Gambar 2.3 : Struktur sel telur matur.....	10
Gambar 2.4 : Anatomi spermatozoa <i>Rattus novergicus</i> .....	11
Gambar 2.5 : Proses fertilisasi <i>Rattus novergicus</i> .....	12
Gambar 2.6 : Model bentuk zona pellusida.....	13
Gambar 2.7 : Bagan proses fertilisasi.....	15
Gambar 2.8 : Pertemuan sel telur dan spermatozoa.....	16
Gambar 2.9 : Keseimbangan oksidan dan antioksidan.....	17
Gambar 2.10 : Ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan.....	18
Gambar 2.11 : Struktur reaksi antara MDA dan DNA.....	19
Gambar 2.12 : Proses peroksidasi lipid yang menghasilkan senyawa aldehyd.....	20
Gambar 2.13 : Reaksi pembentukan molekul flourescence.....	21
Gambar 3.1 : Kerangka konseptual.....	23
Gambar 4.1 : Skema rancangan penelitian.....	26
Gambar 4.2 : Tuba falopii <i>Rattus novergicus</i> .....	31
Gambar 4.3 : Koleksi sel telur <i>Rattus novergicus</i> .....	31
Gambar 4.4 : Spermatozoa <i>Rattus novergicus</i> .....	31
Gambar 4.5 : Kerangka operasional.....	32
Gambar 5.1 : Kadar MDA serum <i>Rattus novergicus</i> .....	34
Gambar 5.2 : Jumlah sel telur <i>Rattus novergicus</i> yang diovolusi.....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Prosedur pembuatan larutan nikotin.....	51
Lampiran 2 : Hasil uji normalitas.....	53
Lampiran 3 : Hasil uji homogenitas.....	54
Lampiran 4 : Hasil Uji <i>One Way Anova</i> .....	55
Lampiran 5 : Hasil uji BNT.....	56
Lampiran 6 : Hasil uji Homogenous Subset.....	57
Lampiran 7 : Hasil pengamatan pengukuran MDA serum.....	58
Lampiran 8 : Gambaran ovum yang berhasil dibuahi sperma (tampak badan polar II).....	60



## DAFTAR SINGKATAN

BNT	:	Beda Nyata Terkecil
BSA	:	<i>Buffer Serum Albumin</i>
CPE	:	<i>Corona Penetrating Enzyme</i>
DNA	:	<i>deoksiribonuklead acid</i>
FSH	:	<i>follicle stimulating hormone</i>
GC	:	<i>Guanin Cystein</i>
HCG	:	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HCl	:	<i>hydrochlorida</i>
IVF	:	<i>in vitro fertilization</i>
kDa	:	kilo dalton
MDA	:	malonildialdehid
MEM	:	<i>Medium Angle Minimum</i>
NaHCO <sub>3</sub>	:	Natrium carbonat
PBS	:	<i>Phosphate buffer solution</i>
PMSG	:	<i>pregnant mare 's serum gonadotropin</i>
rpm	:	rapid per minute
SOD	:	superoksid dismutase
TBA	:	thiobarbituric acid
TCA	:	trichlor aceticacid
TCM	:	<i>tissue culture media</i>
UV	:	ultraviolet
ZP	:	zona pelusida

**BAB 1**  
**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Penelitian**

Indonesia adalah salah satu negara konsumen tembakau terbesar di dunia dan menempati urutan ketiga diantara negara-negara dengan tingkat agregat konsumsi tembakau tertinggi di dunia. Urutan 10 negara konsumsi tembakau dari yang tertinggi adalah Cina, India, Indonesia, Rusia, Amerika Serikat, Jepang, Brazil, Bangladesh, Jerman dan Turki (WHO, 2008).

Produksi rokok di Indonesia menurun dari 213 milyar batang (2000) menjadi 173 milyar batang (2003) atau turun 18,7%, namun sejak 2004 hingga 2008 pertumbuhan rokok di Indonesia sangat besar dari 194 milyar (2004) menjadi 213 milyar batang (2008) atau naik 18,6% selama kurun waktu 5 tahun. Prevalensi merokok yang diperoleh dari laporan WHO (2008) berdasarkan statistik perokok dari kalangan anak-anak dan remaja adalah : pria (24,1%), wanita (4,0%) atau 13,5% anak/remaja, sedangkan dari kalangan dewasa : pria dewasa merokok (63%), wanita dewasa (4,5%) atau 34% perokok dewasa. Gabungan antara perokok kalangan anak, remaja, dan dewasa di Indonesia sekitar 27,6%, artinya setiap 4 orang Indonesia terdapat 1 orang perokok.

Hampir sebagian besar perokok tahu kalau merokok dapat membahayakan kesehatan, tapi bahaya tersebut tidak dipedulikan bahkan jumlah perokok semakin lama semakin meningkat termasuk dikalangan wanita. Wanita yang merokok tidak hanya membahayakan dirinya, tetapi juga mempengaruhi sistem reproduksi, sebab dalam 1 batang rokok mengandung 4000 bahan kimia. Bahan kimia

tersebut dibagi menjadi 3 golongan yaitu nikotin, tar dan karbonmonoksida. Salah satu dampak terhadap reproduksi wanita adalah infertilitas (Rahmi, 2008). Infertilitas didefinisikan sebagai suatu keadaan dimana selama 1 tahun melakukan hubungan seksual tanpa perlindungan dengan alat kontrasepsi tetap tidak dapat menghasilkan konsepsi (Speroff dan Frits, 2005).

Memperhatikan jumlah perokok yang semakin meningkat sehingga pemerintah Kota Surabaya mengeluarkan Peraturan Daerah No. 5 Tahun 2008 tentang kawasan tanpa rokok dan kawasan terbatas merokok. Masyarakat yang melanggar peraturan tersebut akan dikenakan sanksi berupa kurungan 3 bulan penjara atau denda sebesar Rp 50 juta (Pemkot Surabaya, 2008).

Komponen utama dari rokok adalah nikotin karena sekitar 50% rokok mengandung nikotin (Hukkanen, Jacob III, Benowitz, 2005). Nikotin adalah senyawa oksidan yang dapat menyebabkan peroksidasi lipid (Paszowski, Clarke, Hornstein, 2002). Produk dari peroksidasi lipid adalah malonildialdehid (MDA) (Wood, Gibson, Garg, 2003), sehingga MDA dijadikan sebagai indikator proses oksidasi dalam tubuh. Penelitian yang dilakukan oleh Niedernhofer, Daniels, Rouzer, dkk (2003) dikatakan bahwa semakin banyak proses peroksidasi lipid, kadar MDA makin tinggi dan mutasi genetik yang terjadi pada DNA juga semakin banyak. Mutasi genetik yang banyak terjadi adalah delesi (45%). Kerusakan terjadi pada pasangan basa Guanin Cystein (GC).

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa pasangan laki-laki dan perempuan yang mengalami infertil terjadi setelah mengkonsumsi rokok selama lebih dari 5 tahun. Rokok yang dikonsumsi tersebut mengandung nikotin dengan kadar 0,8 hingga 1,8 mg per batang tergantung merek dan ukuran

rokok. Sebesar 1 mg nikotin dapat terserap dalam tubuh saat merokok satu batang (Cohen, 2005). Jensen, Henriksen, Hjollund dkk (1998) melakukan penelitian pada studi populasi menjelaskan wanita yang merokok aktif maupun pasif akan cenderung memiliki angka fekunditas yang rendah dibandingkan dengan wanita yang tidak terpapar asap rokok. Kelainan fertilitas lain yang disebabkan oleh paparan rokok adalah menebalnya zona pelusida dari sel telur sehingga sulit ditembus sperma saat fertilisasi, hal ini dapat terjadi pada perokok aktif dan pasif (Shiloh, Baratz, Koifman, dkk, 2004). Hal yang sama juga dijelaskan oleh Augood (2008) yang menyatakan bahwa risiko infertilitas pada wanita yang merokok 1,6 kali lebih besar daripada wanita yang tidak merokok.

Penelitian Bordel, Laschke, Menger dkk. (2006) membuktikan bahwa nikotin dapat mempengaruhi folikulogenesis hamster setelah diberikan nikotin selama 7 hari. Penelitian lain membuktikan bahwa nikotin dengan dosis 5, 7.5 dan 10 mg/kgBB dapat mempengaruhi proses miosis sel telur mencit (Mailhes, Young, Caldito, dkk., 2000). Dosis tersebut kemudian dikonversikan menjadi dosis untuk tikus dengan dikalikan faktor konversi sebesar 7,0 (Kusumawati, 2004).

Upaya yang dilakukan untuk memperkuat penelitian terdahulu adalah membuktikan apakah nikotin dapat mempengaruhi fertilisasi *in vitro*. Mekanisme yang mendasari adanya gangguan fertilisasi pada wanita yang terpapar nikotin ditinjau dari aspek proses oksidasi belum banyak diteliti, dengan demikian penelitian yang mengukur MDA sebagai produk oksidasi dan angka fertilitas *in vitro* perlu dilakukan. Penelitian ini akan dilakukan terhadap hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) karena secara etis perlakuan ini tidak mungkin dilakukan pada manusia. Keuntungan menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

adalah siklus reproduksinya pendek (4-6 hari), ukuran tubuh cukup besar, mudah dipegang, dikendalikan, dan dapat diambil darahnya dengan jumlah relatif besar. Organ tubuh tikus juga relatif besar sehingga materi perlakuan dapat diberikan dengan berbagai rute (Kusumawati, 2004).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan, maka perumusan masalahnya adalah :

1. Apakah terdapat perbedaan kadar MDA serum pada *Ratus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin?
2. Apakah terdapat perbedaan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin?
3. Apakah terdapat hubungan antara dosis nikotin dengan kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian ini adalah mempelajari pengaruh nikotin terhadap kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus*.

### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan adanya perbedaan kadar MDA serum pada *Ratus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin dengan dosis 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin.

2. Membuktikan adanya perbedaan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin dengan dosis 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin.
3. Membuktikan adanya hubungan antara dosis nikotin dengan kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Ratus novergicus*.

#### **1.4 Manfaat penelitian**

Penelitian yang dilakukan ini merupakan penelitian awal yang dapat menjadi acuan referensi dalam upaya mengembangkan penelitian selanjutnya berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan beberapa manfaat:

##### **1.4.1 Manfaat akademis**

1. Didapatkan efek nikotin terhadap peningkatan kadar MDA serum, tetapi belum mengganggu kualitas sel telur, yang diduga adanya komponen zona pelusida yang masih dapat bertahan untuk melindungi sel telur sehingga zona pelusida tidak rusak dan tetap berhasil melakukan fertilisasi, akan tetapi berpengaruh terhadap kuantitas sel telur yang diovolasi.
2. Dosis nikotin terendah yang dapat mempengaruhi stress oksidatif pada *Rattus novergicus* adalah dosis 52.5 mg/kgBB.

##### **1.4.2 Manfaat praktis**

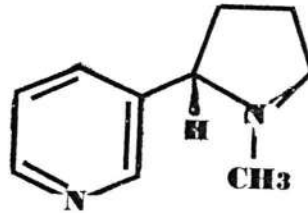
Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat atau sebagai dasar motivasi agar seseorang tidak mengkonsumsi rokok karena kandungan nikotin dalam rokok dapat menurunkan fertilitas.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Nikotin

Nikotin adalah kandungan yang terdapat di daun tembakau yang merupakan senyawa alkaloid (Gambar 2.1). Akar tembakau mengandung 10 - 14 mg nikotin. Sebesar 1-1,5 mg nikotin akan diserap secara sistemik di dalam tubuh. Absorpsi nikotin dipengaruhi oleh pH rokok/asap tembakau selama merokok. Efek nikotin akan lemah dalam situasi basa (pH 8). Derajat keasaman (pH) asap tembakau yang ditemukan pada sebagian besar jenis rokok bersifat asam (pH 5,5-6). pH efektif yang ditemukan diberbagai merek rokok adalah 6 - 7,8 (Hukkanen, Jacob III, Benowitz, 2006).



Gambar 2.1 Struktur molekul nikotin (Jeffery dkk, 1999)

Nikotin diserap dengan cepat ketika asap rokok masuk ke saluran pernafasan, konsentrasi nikotin dalam darah akan meningkat cepat. Sekitar 1 mg nikotin (rata-rata 0,3 - 2 mg) diserap secara sistemik selama merokok. Absorpsi nikotin dari lingkungan yang terisap perokok pasif bisa mencapai 60 hingga 80%. Nikotin diserap 80 - 90% pada perokok aktif. Nikotin akan masuk ke sirkulasi darah pada pH 7,4 setelah diserap. Sekitar 69% nikotin akan terionisasi dan 31%

yang tidak terionisasi. Konsentrasi kotinin (hasil metabolisme nikotin) paling tinggi terdapat di hepar. Konsentrasi nikotin dan kotinin hampir sama dengan kadar di dalam darah pada otot skeletal (Hukkanen, Jacob III, Benowitz 2006).

Beberapa faktor yang mempengaruhi metabolisme nikotin adalah faktor fisiologi, patologi, obat-obatan, kandungan lain dari rokok, ras dan etnik. Faktor fisiologi terdiri dari makanan, usia, farmakokinetika nikotin, perbedaan metabolisme nikotin pada laki-laki dan perempuan, serta kehamilan dan siklus menstruasi. Makanan yang dikonsumsi selama masuknya nikotin dapat menyebabkan konsentrasi nikotin berkurang. Efek maksimal akan terlihat 30 – 60 menit. Aliran darah hepar meningkat sekitar 30% dan detoksifikasi nikotin meningkat sekitar 40% setelah makan. Detoksifikasi nikotin akan berkurang pada usia > 65 tahun. Neonatus memiliki waktu paruh nikotin yang lebih lama, yaitu 3 – 4 kali dibandingkan orang dewasa. Aliran darah di hepar akan berkurang selama tidur sehingga detoksifikasi nikotin juga berkurang. Detoksifikasi nikotin yang dihubungkan dengan berat badan pada laki-laki lebih besar daripada wanita. Kehamilan dan siklus menstruasi juga mempengaruhi aktivitas nikotin melalui hormon seks yaitu konsentrasi estrogen dan progesteron yang lebih tinggi dapat menginduksi aktivitas nikotin (Hukkanen, Jacob III, Benowitz, 2006).

Kondisi patologi yang mempengaruhi metabolisme nikotin meliputi beberapa penyakit seperti penyakit pada hati (hepatitis, karsinoma, penyakit hepar akibat alkohol dan lain-lain), ginjal, trimetylamina, dan lain-lain. Beberapa jenis obat yang dapat menginduksi efek nikotin adalah rifampicin, deksametason, dan fenobarbital, sedangkan yang menghambat efek nikotin adalah metoxalen, tryptamin, kumarin, foranilsipromin dan neomenthyltiol (Hukkanen dkk, 2006).



Kandungan lain dari rokok yang juga dapat menghambat detoksifikasi nikotin adalah karbonmonooksida dan beta nikotirin, sedangkan yang menginduksi efek merokok adalah senyawa glukoronida. Ras dan etnik juga mempengaruhi metabolisme nikotin. Detoksifikasi nikotin pada kulit hitam lebih rendah daripada kulit putih. Bangsa Cina dan Amerika memiliki kemampuan metabolisme nikotin yang lebih rendah daripada bangsa latin dan kulit putih lainnya, sedangkan bangsa Jepang memiliki kadar nikotin yang lebih tinggi (Hukkanen, Jacob III, Benowitz, 2006).

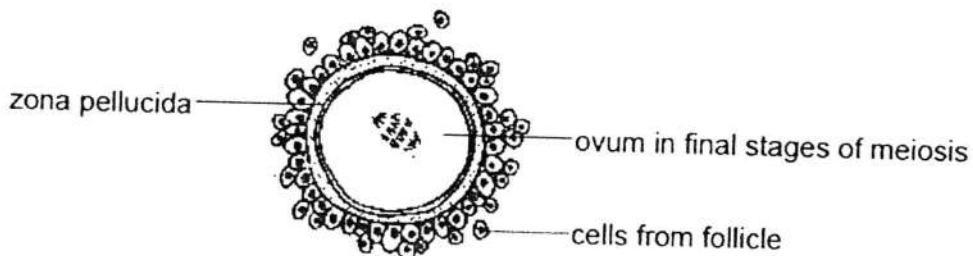
Eksresi nikotin dapat berlangsung melalui ginjal setelah difiltrasi oleh glomeruler, disekresi oleh tubuler dan diabsorpsi pada pH tertentu. Ekskresi juga dapat terjadi melalui feses dan keringat (Hukkanen, Jacob III, Benowitz, 2006).

Nikotin memiliki sifat pro-oksidan. Pro-oksidan ini dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang disertai dengan terganggunya antioksidan lokal secara enzimatik maupun non enzimatik (Paszowski, Clarke, Hornstein, 2002). Antioksidan yang ada di dalam tubuh adalah katalase, Superoksid Dismutase (SOD), enzim transferase, paraoxanase, *heat shock protein 27*, dan protein isomerase akan melindungi tubuh terhadap stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi karena ketidakseimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan dimana pro-oksidan lebih banyak dari antioksidan (Agarwal, Gupta, Sekhon. dkk., 2008). Proses oksidasi akan menyebabkan peroksidasi lipid. Hasil peroksidasi lipid adalah MDA (Wood, Gibson, Garg, 2003). Reaksi oksidatif berupa peroksidasi lipid di dalam tubuh akibat paparan nikotin dapat dideteksi dengan kadar MDA yang ada di serum/jaringan.

Teori tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Chattopadhyay dan Chattopadhyay (2008) yang menyatakan bahwa nikotin menyebabkan peningkatan proses peroksidasi lipid di dalam tubuh, ditandai dengan meningkatnya kadar MDA plasma. Aktivitas enzim anti oksidan (superoksid dismutase dan katalase) juga mengalami penurunan setelah dipapar dengan nikotin.

## 2.2 Sel Telur

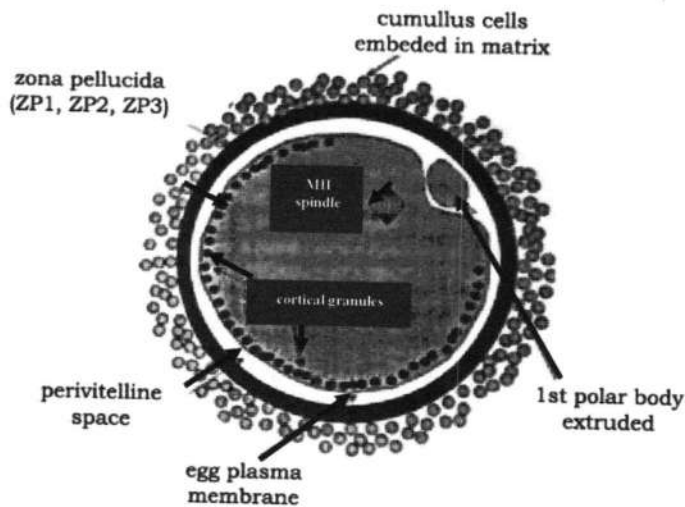
Ovulasi dipengaruhi oleh proses maturasi folikel primer, pada proses awalnya sel telur dikelilingi oleh selapis sel yang kemudian akan membelah dan mengalami diferensiasi. Berkembangnya antrum menjadi folikel yang matur menempatkan sel telur pada posisi tertentu, kemudian sel granulosa mengelilingi sel telur yang disebut sebagai kumulus, yang merupakan tanda maturitas sel telur. Kumulus tersebut akan terus mengelilingi sel telur hingga proses fertilisasi di ampula tuba falopii. Sel granulosa tersebut akan mensekresi mukus menjelang ovulasi. Mukus tersebut sebagian besar mengandung asam hialuronat (Saling, 1996). Gambar sel telur pada *Rattus novergicus* yang sudah siap untuk dibuahi seperti pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Sel telur *Rattus novergicus* (en.wikibooks.org)

Tanda lain yang menunjukkan sel telur sudah matur adalah adanya zona pelusida dan matriks ekstraseluler yang disekresi oleh sel telur. Matriks tersebut sudah dapat dideteksi pada folikel yang sedang berkembang. Proses maturasi sel telur berlangsung melalui pembelahan miosis. Hasil miosis I adalah keluarnya badan polar I (Saling, 1996).

Komponen lain yang terdapat pada sel telur yang sedang berkembang selain kumulus dan zona pelusida adalah adalah granula kortikal. Semua komponen tersebut penting untuk proses fertilisasi. Gambar sel telur yang sudah siap untuk dilakukan fertilisasi seperti pada gambar 2.3 (Saling, 1996)



Gambar 2.3 Struktur sel telur matur (Saling, 1996)

### 2.3 Spermatozoa

Spermatozoa merupakan sel yang dihasilkan dari organ reproduksi jantan (testis) melalui suatu proses yang disebut spermatogenesis. Spermatozoa yang diproduksi oleh testis adalah sel tunggal yang terdiri dari kepala, leher dan ekor. Di dalam kepala terdapat inti yang mengandung kromosom, di dalam tiap-tiap

kromosom mengandung gen yang membawa sifat. Ekor dipakai untuk pergerakan sel spermatozoa, terutama pergerakan dalam alat kelamin betina untuk mencapai sel telur yang berada di daerah tuba fallopii untuk dibuahi (Hardjopranjoto, 1995).

Spermatozoa memiliki fungsi menyebarkan atau menyampaikan sebagian pasangan gen (haploid) kepada ovum untuk kepentingan rekombinasi kromosom seks dan untuk aktivitas pembiakan ovum lebih lanjut. Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma akan lepas dan hilang dari permukaan anterior akrosom (Syahrin, 1994).

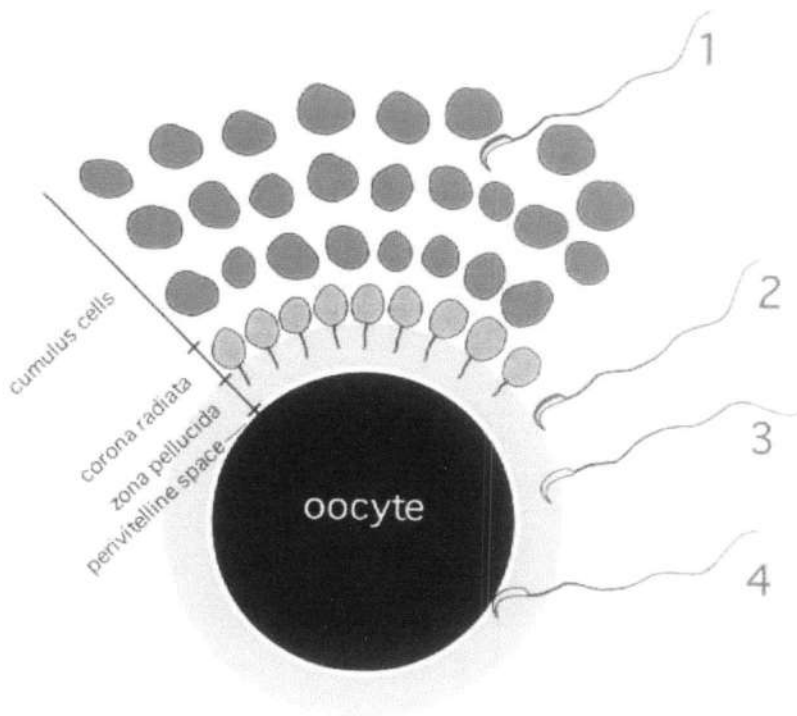
Akrosom adalah suatu massa yang terdapat pada bagian anterior merupakan struktur berupa selubung yang menutupi kurang lebih 2/3 daerah kepala spermatozoa. Akrosom penting karena mengandung enzim-enzim yaitu akrosin, hyaluronidase, *Corona Penetrating Enzyme* (CPE). Akrosin merupakan enzim proteolitik utama untuk penembusan zona pellucida, hyaluronidase berguna untuk menembus cumulus oophorus. Sedangkan CPE digunakan untuk menembus corona radiata (Syahrin, 1994). Gambar spermatozoa pada *Rattus novergicus* dengan bentuk kepala menyerupai kail dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Anatomi spermatozoa *Rattus novergicus* (www.jniosh.go.jp)

## 2.4 Fertilisasi

Bertemunya sperma dan sel telur terjadi di ampula tuba falopii karena merupakan lokasi yang paling lebar dari tuba falopii. Sel telur tersebut dikelilingi oleh zona pelusida memiliki beberapa sifat, yaitu terdiri dari ligand untuk kontak sperma, spesifik untuk spesies tertentu dan akan mengalami reaksi zona untuk mencegah sperma lain membuahi sel telur yang sudah dibuahi oleh sperma terdahulu (Gilbert, 1988). Proses fertilisasi yang terjadi pada *Rattus novergicus* seperti pada Gambar 2.5.



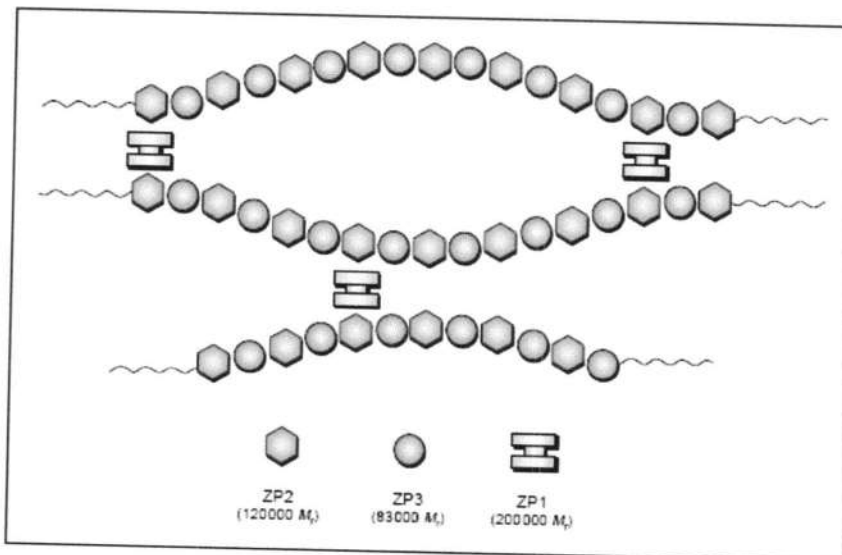
Gambar 2.5 Proses fertilisasi *Rattus novergicus*

Zona pelusida adalah suatu struktur glikoprotein yang disekresi oleh sel telur, akan berikatan dengan sperma saat proses kapasitasasi. Penetrasi zona pelusida dipengaruhi oleh akrosin yang terdapat di permukaan membran akrosom

sperma. Kontak antara sperma dan sel telur diperantarai oleh reseptor yang ada di zona pelusida (Speroff dan Fritz, 2005).

Zona pelusida (ZP) terdiri dari ZP1, ZP2 dan ZP3. ZP3 adalah yang paling berperan dalam proses fertilisasi karena akan berikatan dengan sperma (Speroff dan Fritz, 2005). ZP1 berfungsi untuk mempertahankan integritas struktural matriks zona pelusida. ZP2 berperan untuk ikatan sekunder saat reaksi akrosom sperma dengan zona pelusida. Sedangkan ZP3 berfungsi sebagai reseptor utama untuk kapasitas sperma dan menginduksi reaksi akrosom (Conner dkk., 2005).

Rasio ZP2:ZP3 adalah 1:1, sedangkan ZP1 hanya sekitar 9% dari total jumlah ZP2 dan ZP3 (Gambar 2.6). Zona pelusida berbentuk filamen yang terdiri dari unit ZP2 dan ZP3 yang dihubungkan oleh ZP1. Kandungan zona pelusida terdiri dari komponen protein dan karbohidrat. Zona pelusida merupakan senyawa gel glikoprotein sulfat dengan konsentrasi 2-6%. Struktur gel tersebut yang menggambarkan komponen kimianya (Green, 1997).



Gambar 2.6 Model bentuk zona pelusida (Green, 1997)

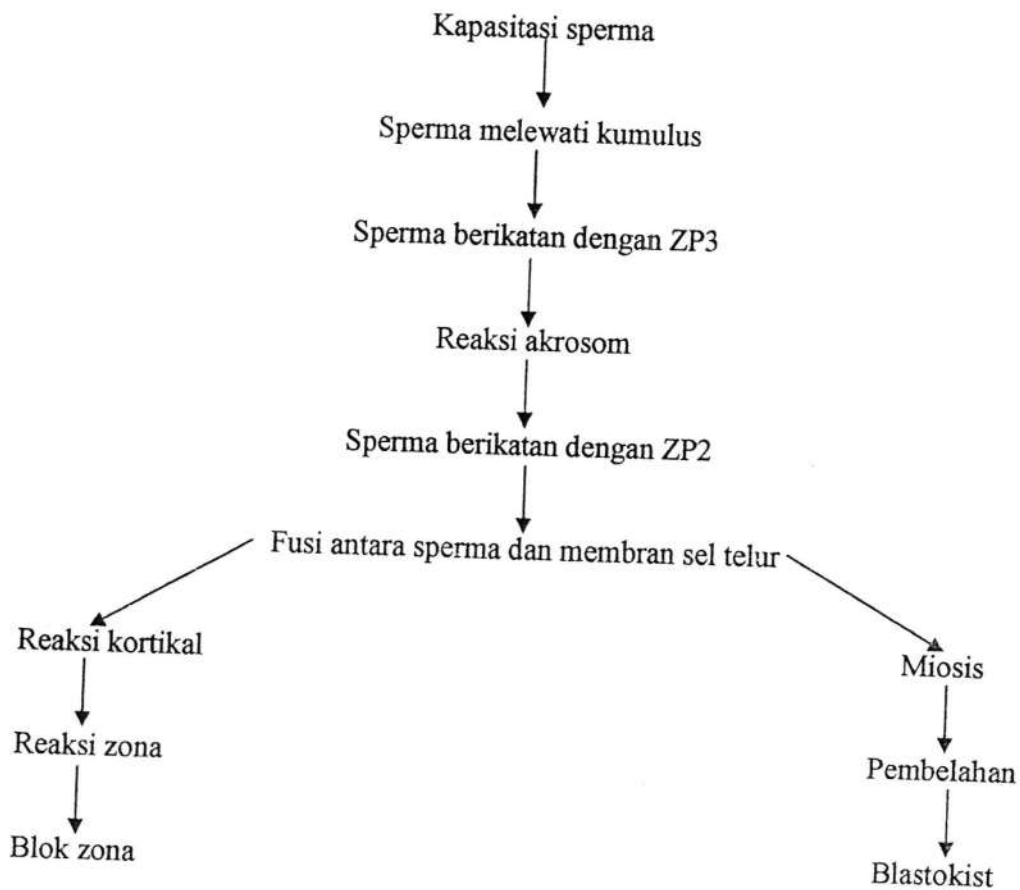
Massa molekul ZP1, ZP2 dan ZP3 berturut-turut adalah 180-200 kilo Dalton (kDa), 120-140 kDa dan 83 kDa. Struktur primer ZP1 terdiri dari 623 asam amino dengan total massa 90-110 kDa. ZP2 mengandung 713 asam amino yang memiliki total massa 64-78 kDa. Sedangkan pada ZP3 terdapat 424 asam amino yang memiliki total massa 57-73 kDa (Rankin dan Dean, 2000).

Komponen selain protein yang terdapat pada zona pellusida adalah karbohidrat. Pemeriksaan sitokimia untuk mengetahui ultrastruktur zona pellusida, diketahui bahwa terdapat distribusi komponen karbohidrat yang heterogen. Pola distribusi tersebut yang mempengaruhi ketebalan zona pellusida. Distribusi ZP3 pada manusia yang mengandung glikoprotein untuk reseptor sperma lebih banyak terdapat di bagian dalam proksimal zona pellusida dibandingkan dengan bagian luarnya, sehingga struktur di bagian dalam menjadi lebih padat daripada bagian luar. Perbedaan distribusi glikoprotein zona pellusida dapat disebabkan oleh sintesis zona pellusida sejak awal. Perbedaan komposisi zona pellusida yang dilihat melalui ketebalannya tersebut berhubungan dengan penetrasi sperma (Jimenez-Movilla, Avilles, Gomez-Torres, dkk., 2004). Proses fertilisasi dapat dilihat pada gambar 2.5.

Gambar 2.5 menjelaskan tentang penetrasi sperma terjadi di zona pelusida, dipengaruhi oleh motilitas sperma, enzim proteinase di akrosom sperma, dan ikatan kepala sperma dengan reseptor zona. Ikatan kepala sperma dengan reseptor zona memproduksi kompleks enzim yang menginduksi reaksi akrosom, melepaskan enzim untuk proses fusi sperma dan membran oosit. Fusi antara sperma dan membran sel telur memicu timbulnya reaksi kortikal, melepaskan

senyawa dari granul kortikal yaitu organel yang berada di bawah membran sel telur.

Reaksi kortikal memicu reaksi zona yang diinduksi oleh enzim, diikuti mengerasnya zona dan inaktivasi ikatan sperma dan reseptor zona untuk menghambat polispermi. Pembelahan sel dimulai setelah fertilisasi. Ekspresi gen dimulai antara stadium 4 dan 8 sel (Speroff dan Fritz, 2005).

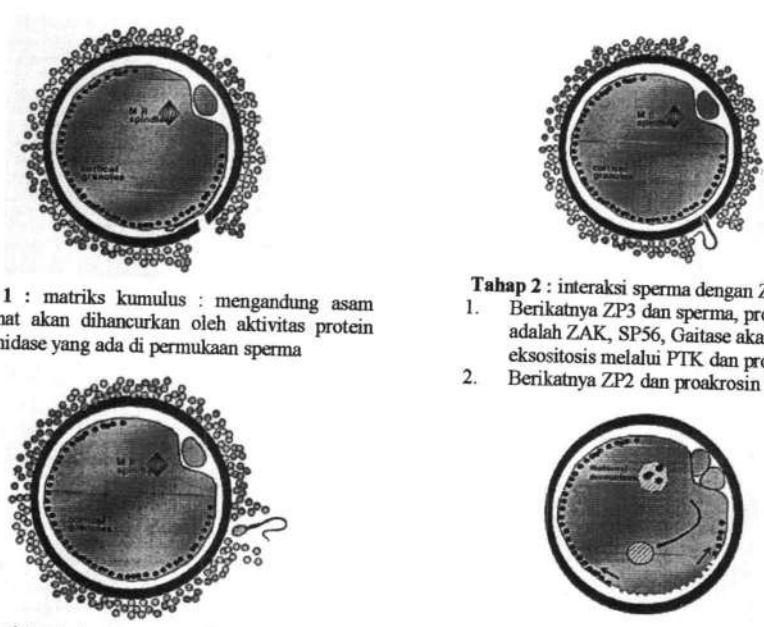


Gambar 2.7 Bagan proses fertilisasi (Speroff dan Fritz, 2005)

Fusi antara sperma dan membran diikuti oleh reaksi kortikal dan aktivitas metabolik dari sel telur. Peningkatan kalsium bebas intraseluler secara periodik membantu reaksi kortikal dan aktivitas sel telur saat fertilisasi. Protein sperma



yang disebut oscillin merupakan senyawa yang dapat mempengaruhi kalsium intraseluler. Blok pada zona pelusida disebabkan oleh reaksi kortikal yang mengeluarkan granul, yaitu organel yang mirip lisosom yang mengandung enzim hidrolitik. Perubahan tersebut kemudian menyebabkan terjadinya reaksi zona, yaitu mengerasnya lapisan ekstraseluler akibat struktur protein dari lapisan tersebut dan terjadi inaktivasi reseptor zona untuk sperma, dengan demikian terjadilah blok zona untuk mencegah polispermi (Speroff dan Fritz, 2005).



**Tahap 1 :** matriks kumulus : mengandung asam hyaluronat akan dihancurkan oleh aktivitas protein hyaluronidase yang ada di permukaan sperma

**Tahap 2 :** interaksi sperma dengan ZP :

1. Berikatnya ZP3 dan sperma, protein sperma yang terikat adalah ZAK, SP56, Gaitase akan memberikan sinyal untuk eksositosis melalui PTK dan protein G
2. Berikatnya ZP2 dan proakrosin sperma

**Tahap 3 :** interaksi antara sperma dan sel telur : membrane plasma dan sel telur bersatu dibantu oleh fertilin sehingga terjadi interaksi antara keduanya

**Tahap 4 :** setelah penetrasi :

1. Terjadi blok dari zona pelusida unruk mencegah polispermi (ZP2 dan ZP3 tidak bisa dimasuki sperma lain)
2. Miosis telah berlangsung secara komplit, diketahui dengan adanya 2 badan polar dan pronukleus maternal
3. Transformasi nucleus sperma menjadi pronukleus jantan

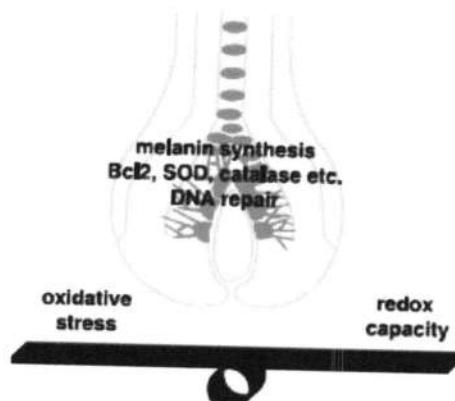
Gambar 2.8 Pertemuan sel telur dan spermatozoa (Saling, 1996)

Perubahan awal terbentuknya blok zona adalah dengan depolarisasi cepat membran sel telur dengan keluarnya kalsium oleh kalmodulin. Meningkatnya kalsium intraseluler memicu sintesis protein di dalam sel telur. Depolarisasi

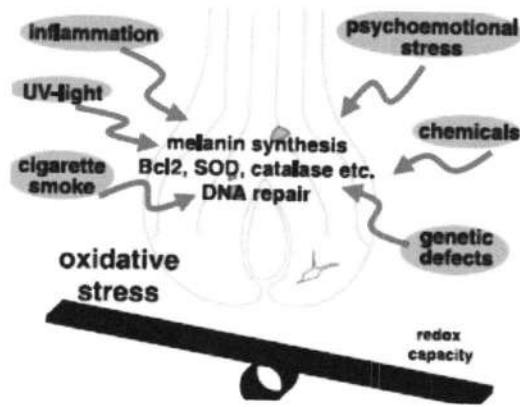
membran memblok masuknya sperma. Blok yang permanen dihasilkan dari reaksi kortikal yang mengeluarkan enzim yang juga dipicu oleh tingginya kadar kalsium. Gen ZP3 hanya diekspresikan pada sel telur yang berkembang. Mencit yang mengalami kerusakan gen ZP3 akan memproduksi zona pelusida yang tidak sempurna sehingga tidak dapat dibuahi dan mencit tersebut tidak dapat bunting (Speroff dan Fritz, 2005).

### 2.5 Efek Nikotin terhadap Reaksi Oksidatif dan Fertilisasi

Senyawa alkaloid utama dari rokok adalah nikotin yang memiliki sifat pro-oksidan, yaitu menyebabkan reaksi oksidatif di dalam sel (terjadi stres oksidatif). Kondisi ini terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara antioksidan dengan proses pro-oksidan di dalam sel darah, plasma darah dan jaringan (Zenzes, 2000; Wood dkk., 2003; Chattopadhyay dan Chattopadhyay, 2008).



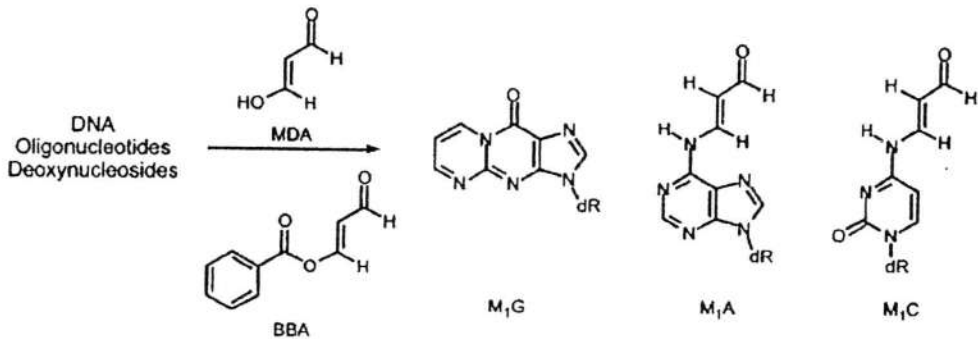
Gambar 2.9 Keseimbangan oksidan dan antioksidan (Arck, Overall, K Spatz dkk., 2006)



Gambar 2.10 Ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan (Arck, Overall, K Spatz dkk., 2006)

Gambar 2.9 menjelaskan bahwa jika terjadi keseimbangan antara oksidan dan antioksidan maka tidak akan terjadi stres oksidatif. Gambar 2.10 menjelaskan bahwa adanya pengaruh proses inflamasi tubuh, stress psikoemosional, paparan rokok, sinar ultraviolet (UV), kelainan genetik dan senyawa kimia lainnya terhadap rendahnya antioksidan sehingga terjadi stres oksidatif.

Stres oksidatif merupakan reaksi radikal bebas yang akan menyebabkan terjadinya proses peroksidasi lipid. Hasil akhir peroksidasi lipid adalah MDA, jika terjadi terus-menerus maka timbullah akumulasi MDA secara sistemik yang merupakan gambaran adanya stress oksidatif. Penelitian yang dilakukan pada hewan coba yang dipapar oleh asap rokok menunjukkan tingginya kadar MDA di hepar dan serum. Proses ini akan merusak mitokondria dan DNA (Gambar 2.11) (Zenzes, 2000; Wood dkk., 2003; Chattopadhyay dan Chattopadhyay, 2008).



Gambar 2.11 Struktur reaksi antara MDA dan DNA (Niedernhofer dkk., 2003)

Keterangan gambar:

BBA :  $\beta$ -benzoyloxyacrolein

M<sub>1</sub>G : *pyrimido[1,2- $\alpha$ ]purin-10(3H)-one*

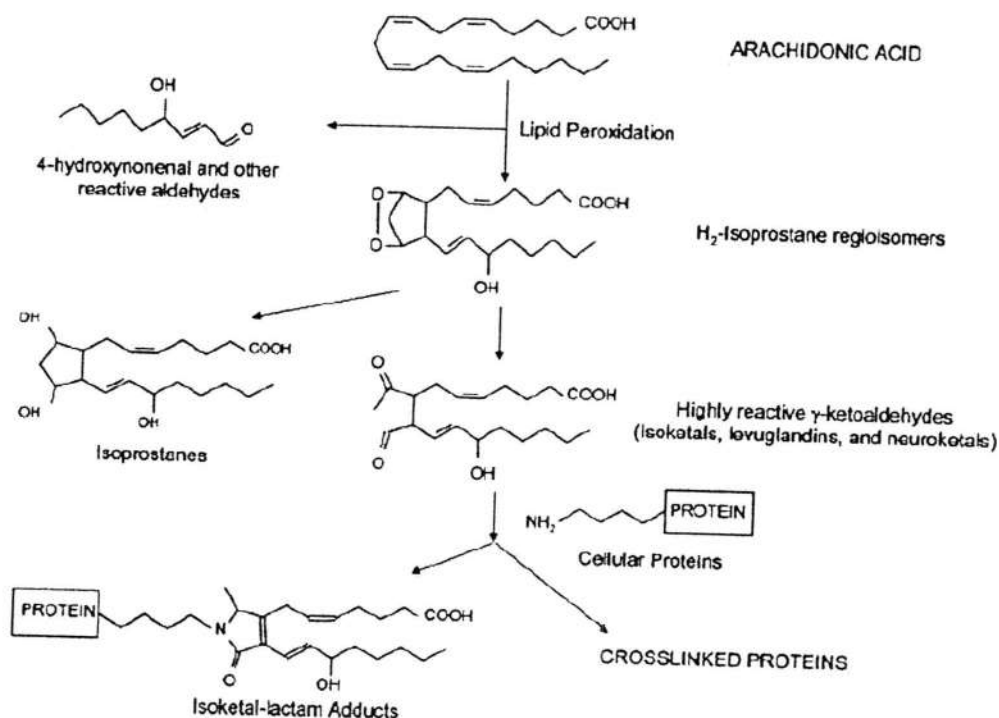
M<sub>1</sub>C : *N4-oxopropenyl-deoxycytidine*

dR : deoksiribosa

MDA adalah hasil dari reaksi enzimatik yang bersifat genotoksik endogen dan peroksidasi lipid yang diinduksi oleh radikal oksigen. Reaksi ini dapat menyebabkan kerusakan *Deoksiribonuklead Acid* (DNA) dan berpotensi terjadinya mutasi genetik karena menyebabkan terjadinya delesi pada pasangan basa nukleotida, akibatnya akan terjadi perubahan/efek terhadap proses biologi di dalam tubuh (Niedernhofer, Daniels, Rouzer dkk., 2003).

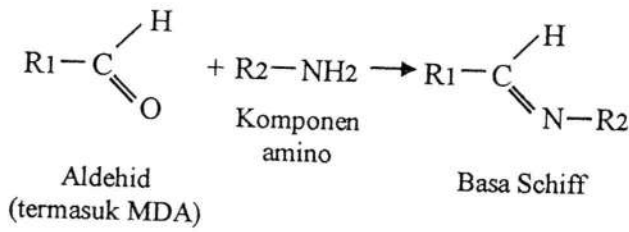
Proses peroksidasi lipid yang merupakan rangkaian reaksi untuk menghasilkan DNA dapat dilihat pada gambar 2.12. Gambar 2.12 menjelaskan bahwa adanya peroksidasi lipid akan merusak asam arakidonat. Setelah melalui reaksi tertentu akan menghasilkan senyawa aldehid yang bersifat reaktif, termasuk

MDA. Proses tersebut akan merusak senyawa protein (Barry Halliwell and John MC. Gutteridge, 1999).



Gambar 2.12 Proses peroksidasi lipid yang menghasilkan senyawa aldehid

Senyawa aldehid yang bersifat toksik (MDA) yang merupakan hasil akhir peroksidasi lipid dapat ditemukan dilingkungan sekitar termasuk asap rokok. Asap rokok terdiri dari banyak senyawa aldehid, jika bereaksi dengan DNA maka senyawa aldehid tersebut akan berikatan dengan basa DNA (guanin sistein). Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan pemeriksaan fluorescence. MDA terdiri dari dua kelompok karbon (C) dapat bereaksi dengan komponen amino yang lain untuk memproduksi molekul fluorescence. Reaksi pembentukan molekul *fluorescence* seperti pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Reaksi pembentukan molekul fluorescence

Hasil akhir reaksi tersebut dinamakan basa Schiff amino imino propen yang terbentuk pada kondisi asam. MDA merupakan salah satu kontributor dalam pembentukan molekul fluorescence tersebut, aktivitas MDA rendah pada pH 7,4.

Rusaknya protein/DNA akan mempengaruhi banyak sel di dalam tubuh, termasuk sel telur. Kerusakan DNA pada sel telur akan menyebabkan kelainan ekspresi gen, salah satunya ekspresi gen pada zona pelusida. Zona pelusida yang mengelilingi sel telur berperan penting sebelum dan setelah fertilisasi. Kondisi zona pelusida pada perokok aktif dan pasif berbeda dengan zona pelusida pada bukan perokok yang menyebabkan sulitnya terjadi fertilisasi pada perokok aktif dan pasif (Shiloh, Baratz, Koifman, dkk., 2004).

Penetrasi sperma untuk menembus matriks kumulus ooforus sel telur dibantu oleh enzim hyaluronidase pada membran kepala sperma. Selubung ekstraseluler sel telur spesifik untuk mengenali sperma dari spesies yang sama. Zona pelusida terdiri dari senyawa glikoprotein sedangkan sperma mengandung oligosakarida. Kelainan ekspresi gen pada zona pelusida menyebabkan komponennya tidak bisa diakses oleh sperma sehingga tidak terjadi fertilisasi, dengan demikian adanya nikotin menyebabkan zona pelusida tidak dapat

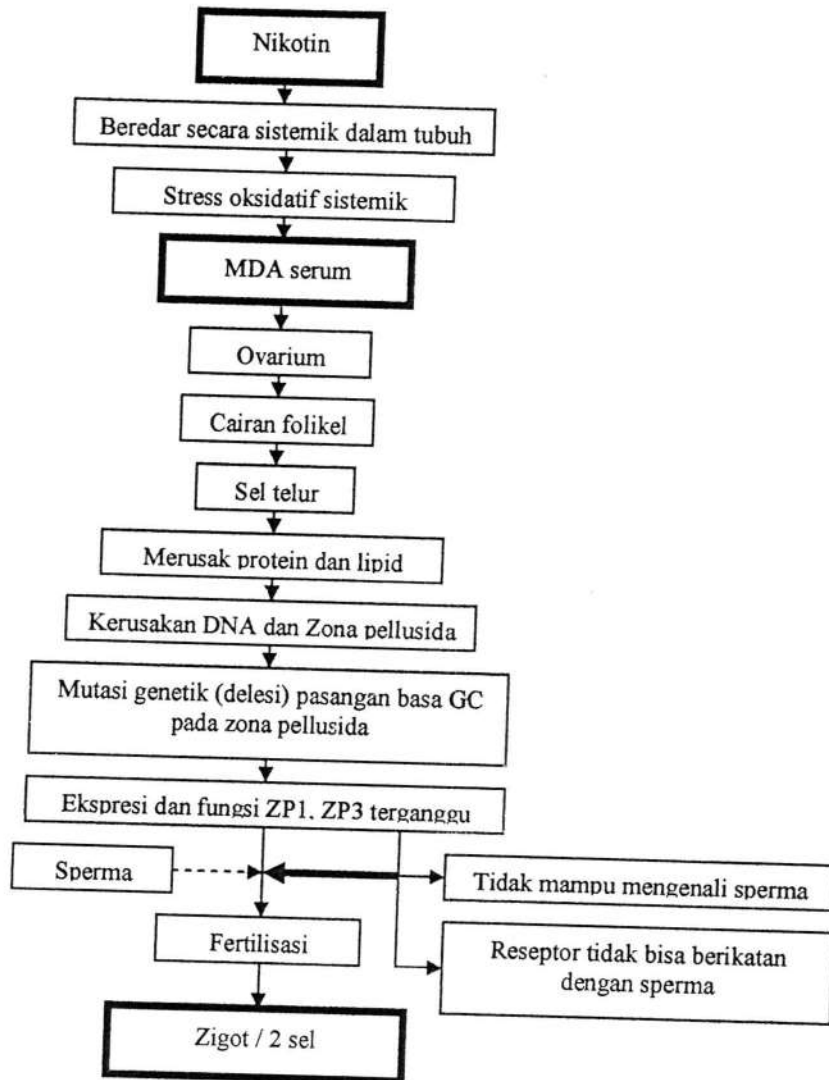
mengenali sperma dan reseptornya tidak mampu mengikat sperma (Talbot, Shur, and Myles, 2003).

Penelitian terakhir menunjukkan kemungkinan penyebab infertilitas pada wanita disebabkan oleh kelainan gen ZP1 dan ZP3 yang menyebabkan adanya perubahan matriks pada zona pelusida itu sendiri sehingga mengganggu proses fertilisasi oleh sperma (Conner, Lefievre, Hugehes dkk., 2005).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Keterangan gambar:

- Menyebabkan
- Bertemu dengan sel telur
- ➔ Faktor yang mempengaruhi
- ▭ Diteliti
- ▭ Tidak diteliti



Nikotin memiliki sifat pro-oksidan, yaitu menyebabkan reaksi oksidatif di dalam sel (stres oksidatif). Stres oksidatif akan menyebabkan terjadinya proses peroksidasi lipid dengan produk yang dihasilkan adalah MDA, jika terjadi terus-menerus maka timbullah akumulasi stres oksidatif yang akan merusak mitokondria dan DNA (Zenzes, 2000; Wood, Gibson, Garg, 2003). Rusaknya DNA akan mempengaruhi banyak sel di dalam tubuh, termasuk sel telur. Kerusakan DNA pada sel telur akan menyebabkan kelainan ekspresi gen, salah satunya ekspresi gen pada zona pelusida.

Kelainan gen ZP1 dan ZP3 yang menyebabkan adanya perubahan matriks pada zona pelusida itu sendiri sehingga mengganggu proses fertilisasi oleh sperma (Conner, Lefievre, Huges, dkk, 2005). Kelainan ekspresi gen pada zona pelusida menyebabkan komponennya tidak bisa diakses oleh sperma karena tidak dapat mengenali sperma dan reseptornya tidak dapat berikatan dengan sperma, sehingga tidak terjadi fertilisasi, dengan demikian adanya nikotin menyebabkan zona pelusida tidak dapat mengenali sperma dan reseptornya tidak mampu mengikat sperma sehingga tidak terjadi fertilisasi dan tidak ditemukan adanya gambaran badan polar II (Talbot, Shur, and Myles, 2003).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang permasalahan, tujuan penelitian, tinjauan kepustakaan, dan kerangka konseptual, maka hipotesis pada penelitian ini adalah :

1. Terdapat perbedaan kadar MDA serum pada *Rattus novergicus* yang diberi injeksi nikotin 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin
2. Terdapat perbedaan keberhasilan fertilisasi *invitro* pada *Rattus novergicus* yang diberi injeksi nikotin 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin.
3. Terdapat hubungan antara dosis nikotin dengan kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *invitro* pada *Rattus novergicus*.

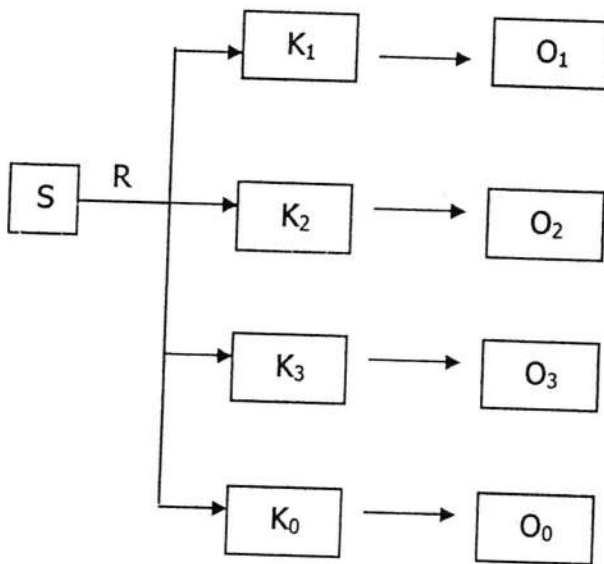
## BAB 4

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

## 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian bersifat eksperimental dengan memberikan perlakuan pada *Rattus novergicus*. Perlakuan tersebut berupa injeksi nikotin subkutan dengan dosis 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa diberi nikotin. Rancangan yang digunakan adalah *post test only control group design*. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok perlakuan yang dipilih secara acak.

Skema rancangan penelitian adalah :



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan :

- S : Sampel  
 R : Random  
 K<sub>1</sub> : Hewan coba diberi nikotin 70 mg / Kg BB  
 K<sub>2</sub> : Hewan coba diberi nikotin 52,5 mg / Kg BB  
 K<sub>3</sub> : Hewan coba diberi nikotin 35 mg / kg BB  
 K<sub>0</sub> : Hewan coba diberi Aquades  
 O<sub>0</sub> – O<sub>3</sub> : Pengamatan hasil kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi  
*in vitro*

#### 4.2. Populasi, besar sampel dan teknik pengambilan sampel

Populasi yang digunakan adalah tikus betina dewasa dengan kriteria sampel sehat dan fertil, tidak bunting, usia 8 – 10 minggu, berat badan 250 – 300 gram, dan diperoleh dari tempat yang sama.

Besar sampel berdasar perhitungan (Kemas 1991) yaitu :

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

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

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

$$2r - 2 \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$2r \geq 17$$

$$r \geq 8,5$$

$$= 9$$

Mengantisipasi kemungkinan tikus mati jumlah sampel ditambahkan menjadi 10 ekor/kelompok.

### 4.3. Variabel Penelitian

#### 4.3.1. Klasifikasi variabel

Variabel pada penelitian ini adalah variabel bebas, tergantung dan kendali. Variabel bebas adalah nikotin dengan dosis 70, 52.5, 35 mg/kgBB dan tanpa nikotin. Variabel tergantung adalah kadar MDA serum dan angka fertilisasi. Variabel kendali adalah kesehatan hewan coba, jenis makanan, pemeliharaan, dan pembuatan preparat nikotin, alat ukur yang digunakan.

#### 4.3.2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional penelitian seperti pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel

NO	VARIABEL	DEFINISI OPERASIONAL	CARA PENGUKURAN	HASIL UKUR	SKALA
1.	Nikotin	Larutan alkaloid dengan konsentrasi 70% yang diencerkan dengan akuabides.	70 mg/kg BB 52,5 mg/kg BB 35 mg/kg BB  Diberikan nikotin	mg  Diberi: 1 Tidak diberi: 0	Rasio  Nominal
2	Kadar MDA serum	Produk peroksidasi lipid	Menggunakan spektrofotometer, kadar MDA diukur menggunakan garis regresi dari kurva baku larutan MDA	Kadar pada serum (nmol/ml)	Rasio
3	Keberhasilan fertilisasi <i>in vitro</i>	Proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan sel telur dan spermatozoa d luar tubuh	Menghitung zigot/2 sel	Jumlah	Nominal

#### 4.4. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah larutan nikotin 70 %, minuman tikus ad libitum, makanan 5 g/100 g BB, *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) dan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG), sekam untuk alas kandang, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *tissue culture medium* (M16/M2/MEM), dan *mineral oil*.

#### 4.5. Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan untuk penelitian ini adalah kandang, kertas alas kandang, *syringe* injeksi 1 cc, kaca objek dengan penutup, inkubator CO<sub>2</sub>, oven, *laminary flow*, lemari es, mikroskop *inverted*, mikropipet dan pipet modifikasi, *mikroskop dissecting*, *petridish disposable*, timbangan analitik, dan sentrifuse.

#### 4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium *invitro* Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya pada bulan Maret-Mei 2010, pengolahan data dilakukan pada bulan Juni-Juli 2010.

#### 4.7 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data

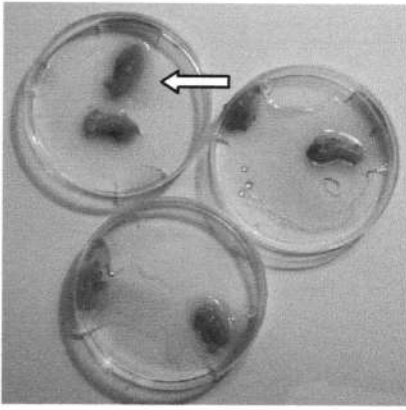
##### 4.7.1 Pembuatan larutan nikotin

Larutan nikotin murni dengan konsentrasi 70% akan dilarutkan dengan akuabides seperti pada lampiran 1. Larutan nikotin yang telah diencerkan akan diberikan sesuai dosis yang ditentukan untuk masing-masing kelompok perlakuan.

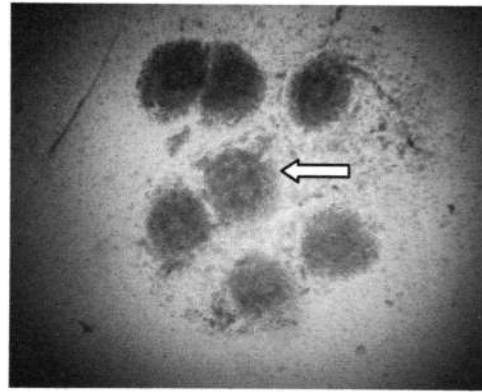
#### 4.7.2 Perlakuan dan pengamatan

Persiapan penelitian dilakukan dengan melakukan adaptasi hewan coba selama 7 hari di dalam kandang. Tikus sebagai hewan coba kemudian dibagi menjadi 4 kelompok (1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan). Kelompok perlakuan disuntikan nikotin dengan dosis 70, 52.5, 35 mg/kgBB subkutan, sekali sehari selama 7 hari.

Koleksi sel telur dilakukan dengan cara mempersiapkan medium yang terdiri dari : MEM 0,35 mg, NaHCO<sub>3</sub> 0,22 mg, gentamisin 40 µl, BSA 0,3% dilarutkan dalam 100 cc dianes water kemudian disimpan dalam inkubator. Koleksi sel telur : tikus betina untuk kontrol diberi injeksi aquadest 0,1 cc secara subkutan setiap hari satu kali selama 7 hari, tikus betina yang diberi perlakuan dengan injeksi nikotin dengan dosis masing-masing kelompok 70 mg/kgBB, 52,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB sebanyak 0,1 cc secara subkutan setiap hari satu kali selama 7 hari. Hari ke-8 diberi injeksi PMSG 10 iu secara subkutan ditunggu 48 jam untuk superovulasi sel telur. Hari ke-10 injeksi HCG 10 iu subkutan untuk maturasi sel telur. Tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan yang sudah divasektomi, ditunggu 17 jam. Tikus dikorbankan, diambil sampel darah dari jantung untuk pemeriksaan MDA serum kemudian dilakukan laparatomi dengan mengangkat tuba falopii kiri kanan, dimasukkan dalam medium yang sudah disiapkan. Tuba dilihat dibawah mikroskop, kantung telur dibuka, sel telur diambil dengan menggunakan mikropipet. Pencucian sel telur sebanyak 3 kali dengan larutan medium. sel telur dimasukkan dalam medium yang sudah disiapkan dalam *petridisk* dan difiksasi dengan mineral oil. Selanjutnya disimpan dalam inkubator dengan suhu 37,5°C.

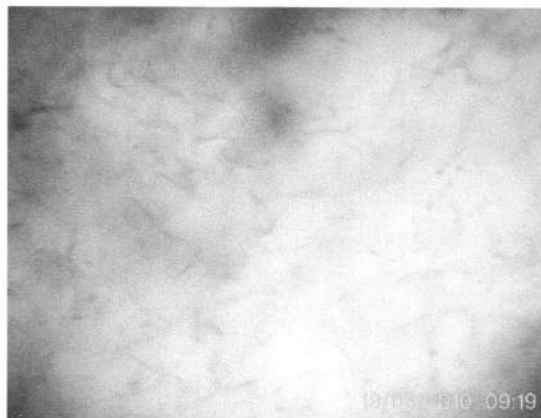


Gambar 4.2 Tuba falpii  
*Rattus novergicus*



Gambar 4.3 Koleksi sel telur  
*Rattus novergicus*

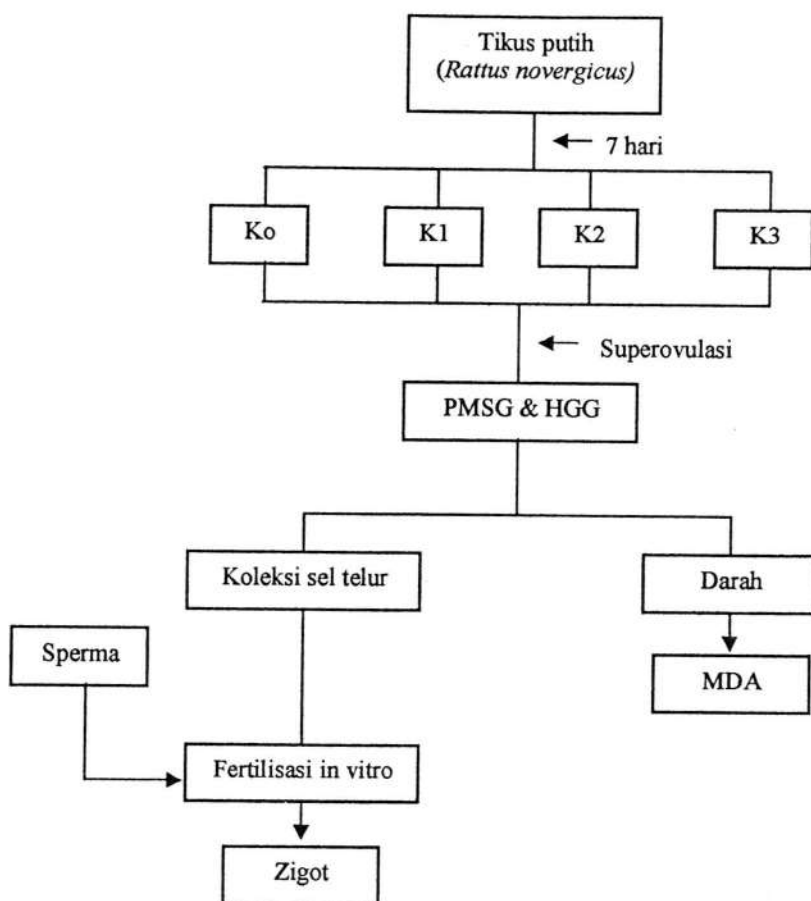
Koleksi semen (spermatozoa) dilaksanakan dengan cara persiapan tikus jantan usia 16-20 minggu. Tikus dikorbankan dengan cara dekapitasi, kemudian hewan coba ditelentangkan di atas papan seksi dan dilakukan pembedahan. Pembedahan dimulai dari abdomen bawah ke arah atas dengan menggunakan gunting kecil, selanjutnya dicari kedua saluran epididimis dan kauda epididimis. Kedua kauda epididimis diangkat kemudian dipotong-potong dan dimasukkan ke dalam larutan medium yang sudah disiapkan, dilihat dibawah mikroskop adanya spermatozoa yang motil dan selanjutnya disimpan di dalam inkubator suhu 37,5°C selama 1 jam. Gambar sperma yang telah dikoleksi seperti pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Spermatozoa *Rattus novergicus*



## 4.7.3 Kerangka operasional



Gambar 4.5 Kerangka operasional

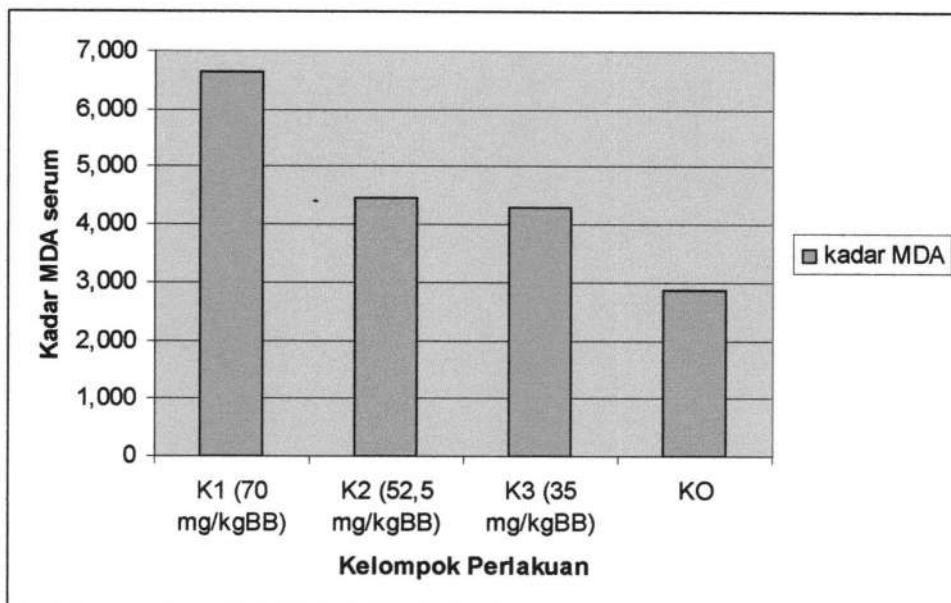
Prosedur untuk mengukur kadar MDA serum dilakukan dengan mengambil serum darah tikus 0,5 ml, ditambah larutan PBS 4,5 ml; selanjutnya dikocok, dipusingkan 3000 rpm selama 15 menit, ambil supernatan 4 ml, tambah TCA 15% 1 ml, tambahkan 1 ml TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N, panaskan dalam waterbath 80°C selama 15 menit, dinginkan pada suhu ruang, pusingkan 3000 rpm selama 15 menit, ukur absorbansi supernatan pada 532 nm. Kadar MDA dalam serum diukur dengan menggunakan garis regresi dari kurva baku larutan MDA (lampiran 7).

#### 4.8. Cara Pengolahan dan Analisis Data

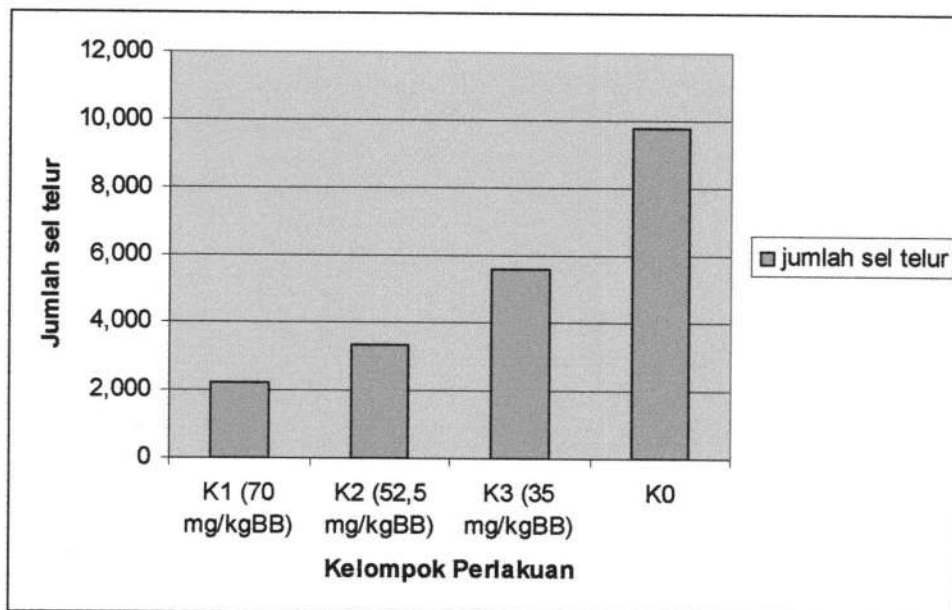
Perbedaan kadar MDA serum dari 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dianalisis dengan menggunakan uji Anova 1 arah dengan asumsi yang harus dipenuhi adalah data berdistribusi normal, mempunyai varians yang sama dan tidak ada korelasi di antara ke-4 kelompok tadi, selanjutnya untuk melihat perbedaan yang paling dominan dilakukan *post hoc* analisis dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

**BAB 5****HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN****5.1 Data Penelitian**

Hasil penelitian ini didapat dari 36 ekor tikus putih (*Rattus novergicus*) yang terbagi menjadi 4 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan yang diberi nikotin dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan terdiri dari *Rattus novergicus* yang diberikan nikotin dosis 70 mg/kg BB (K1), 52.5 mg/kg BB (K2) dan 35 mg/kg BB (K3). Kelompok kontrol diberikan injeksi akuadest subkutan (K0). Gambaran hasil penelitian seperti pada Gambar 5.1 dan Gambar 5.2.



Gambar 5.1 Kadar MDA serum *Rattus novergicus*



Gambar 5.2 Jumlah sel telur *Rattus norvegicus* yang diovlasi

Hasil pada Gambar 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar MDA serum tertinggi terdapat pada kelompok K1 (6,642) dan yang terendah berasal dari kelompok kontrol (2,865). Hasil pada Gambar 5.2 menunjukkan rerata jumlah sel telur yang paling banyak berasal dari kelompok kontrol (9,778), sedangkan yang paling sedikit berasal dari kelompok K1 (2,222). Seluruh sel telur yang diovlasi dari *Rattus norvegicus* kelompok kontrol dan perlakuan berhasil difertilisasi.

## 5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini seperti pada Tabel 5.1 dan Tabel 5.2.

Tabel 5.1 Rerata kadar MDA serum *Rattus norvegicus*

VARIABEL	K1 (70 mg/kgBB)	K2 (52,5 mg/kgBB)	K3 (35 mg/kgBB)	KO (Kontrol)
Rerata	6,642	4,454	4,313	2,865
SD	1,157	1,865	0,472	0,298

Tabel 5.2. Rerata jumlah sel telur yang diovulasikan dan keberhasilan fertilisasi *Rattus novergicus*

VARIABEL	K1 (70 mg/kgBB)	K2 (52,5 mg/kgBB)	K3 (35 mg/kgBB)	KO (Kontrol)
Rerata jumlah ovum yang diovulasikan	2,222	3,333	5,555	9,778
Keberhasilan fertilisasi	100%	100%	100%	100%
Kegagalan fertilisasi	0	0	0	0

Seluruh data kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk memenuhi syarat melakukan analisis parametrik. Perbandingan keberhasilan fertilisasi dan kadar MDA serum diuji dengan Anova satu arah, jika terdapat perbedaan bermakna dilakukan uji BNT.

### 5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Hasil uji normalitas dengan *one sample* Kolmogorov Smirnov menunjukkan datanya berdistribusi normal ( $p=0,631$ ) yang memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik (*one way Anova*). Uji *one sample* Kolmogorov Smirnov seperti pada Lampiran 2. Hasil uji homogenitas varians didapatkan semua data tersebut mempunyai data yang homogen ( $p=0,128$ ), dapat dilihat pada lampiran 3.

Tujuan dilakukannya analisis homogenitas varians adalah untuk menguji berlaku/tidaknya asumsi untuk Anova satu arah, yaitu apakah ke-4 sampel kelompok penelitian mempunyai varians yang sama dengan hipotesis  $H_0 =$  ke-4 varians populasi adalah identik,  $H_1 =$  ke-4 varians populasi tidak identik. Pengambilan keputusan dilakukan jika probabilitas  $<0,05$ , maka  $H_0$  ditolak, demikian pula sebaliknya jika probabilitas  $>0,05$  maka  $H_0$  diterima. Data menunjukkan terlihat bahwa *Levene statistic* bernilai 2,042 dengan nilai

probabilitas sebesar 0,128 maka  $H_0$  diterima yang berarti bahwa ke-4 kelompok penelitian adalah identik.

### 5.2.2 Hasil Uji Anova Satu Arah

Syarat dapat dilakukannya uji Anova satu arah ada 3 yaitu data berdistribusi normal, mempunyai varians yang homogen, dan tidak terdapat interaksi di antara sampel pada masing-masing kelompok. Hasil uji Anova satu arah adalah sebagai berikut: setelah ke-4 varians terbukti sama baru dilakukan uji Anova untuk menguji apakah ke-4 kelompok penelitian sampelnya mempunyai rata-rata/mean yang sama dengan hipotesis, yaitu  $H_0 =$  ke-4 rata-rata populasi/kelompok adalah identik,  $H_1 =$  ke-4 rata-rata populasi/kelompok tidak identik.

Pengambilan keputusan didasarkan pada  $F$  hitung dengan  $F$  tabel, jika statistik hitung (angka  $F$  *output* > statistik tabel/Tabel  $F$ ) maka  $H_0$  ditolak. Jika statistik hitung ( $F$  *output* < statistik tabel/Tabel  $F$ ) maka  $H_0$  diterima. Besar  $F$  hitung dari output adalah 16,98. Tingkat signifikansi  $\alpha$  adalah 5% dengan tingkat kepercayaan 95%. Numerator = 3, denominator = jumlah perlakuan dikurangi jumlah variabel kelompok ( $36 - 4 = 32$ ). Dari Tabel  $F$  didapatkan 2,90 artinya  $F$  hitung >  $F$  tabel sehingga terdapat perbedaan yang bermakna.

Berdasarkan nilai probabilitas, jika probabilitas >0,05  $H_0$  diterima. Jika probabilitas <0,05  $H_0$  ditolak. Terlihat bahwa  $F$  hitung = 16,98 dengan probabilitas 0,000 sehingga kelompok perlakuan tersebut memang berbeda nyata (Lampiran 4). Hubungan antara dosis nikotin dengan keberhasilan fertilitas tidak dilakukan pengujian karena semua ovum yang dilakukan fertilisasi invitro semuanya fertil.

### 5.2.3 Hasil Uji Beda Nyata Terkecil/BNT (*Post Hoc Test*)

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara kelompok perlakuan, masalah yang akan dibahas selanjutnya adalah kelompok perlakuan mana saja yang berbeda dan kelompok mana saja yang tidak berbeda. Pembahasan ini dikerjakan dengan menggunakan Bon Ferroni dan Tukey Test (Lampiran 5).

Pada uji statistik ini terdiri dari 4 kelompok, yaitu K1 untuk *Rattus novergicus* diberi nikotin dosis 70 mg/kgBB, K2 untuk *Rattus novergicus* diberi nikotin dosis 52,5 mg/kgBB, K3 untuk *Rattus novergicus* diberi nikotin dosis 35 mg/kgBB dan K0 untuk kelompok kontrol diberi injeksi aquadest.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K1 dan K0. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 3,78. Angka ini didapat dari mean K1 dikurangi mean K0. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut 2,31 s.d. 5,25. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,000 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K1 dan K0 berbeda secara nyata.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K1 dan K2. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 1,52. Angka ini didapat dari mean K1 dikurangi mean K2. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut 0,05 s.d. 2,99. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,040 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K1 dan K2 berbeda secara nyata.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K1 dan K3. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 2,33. Angka ini

didapat dari mean K1 dikurangi mean K3. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut 0,82 s.d. 3,84. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,001 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K1 dan K3 berbeda secara nyata.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K2 dan K0. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 2,25. Angka ini didapat dari mean K2 dikurangi mean K0. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut 0,79 s.d. 3,72. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,001 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K2 dan K0 berbeda secara nyata.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K2 dan K3. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 0,81. Angka ini didapat dari mean K2 dikurangi mean K3. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut -0,71 s.d. 2,32. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,48 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K2 dan K3 tidak berbeda secara nyata.

Pada uji Tukey BNT yang menguji perbedaan antara K3 dan K0. Pada kolom mean different diperoleh perbedaan rata-rata sebesar 1,45. Angka ini didapat dari mean K3 dikurangi mean K0. Pada kolom 95% terdapat rentang perbedaan mean tersebut -0,067 s.d. 2,96. Berdasarkan nilai probabilitas terlihat bahwa nilai probabilitas 0,065 sehingga perbedaan rata-rata MDA pada K3 dan K0 tidak berbeda secara nyata.



#### 5.2.4 Uji Homogenitas Subset

Uji ini dilakukan untuk menguji kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan (Lampiran 6). Subset 1 terlihat hanya kelompok/group dengan anggota kelompok 1 yang berbeda dengan lainnya.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Efek Nikotin terhadap Kadar MDA Serum

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa kadar MDA serum meningkat seiring dengan meningkatnya kadar nikotin yang diberikan pada *Rattus novergicus*. Kadar MDA serum yang paling tinggi terdapat pada kelompok K1 karena dosis nikotin yang diberikan juga paling tinggi.

Nilai deskriptif tersebut didukung dengan uji statistik *one way Anova* taraf kepercayaan 95%, yang menunjukkan terdapat perbedaan kadar MDA serum yang bermakna pada berbagai kelompok perlakuan. Hal ini berarti kadar MDA serum pada kelompok yang diberikan nikotin lebih tinggi, daripada kelompok kontrol yang tidak diberikan nikotin.

Hasil tersebut disebabkan oleh nikotin yang memiliki sifat pro-oksidan, yaitu menyebabkan reaksi oksidatif di dalam sel (stres oksidatif). Stres oksidatif akan menyebabkan terjadinya proses peroksidasi lipid. Produk yang dihasilkan dari peroksidasi lipid tersebut adalah MDA, yang dapat terdeteksi di dalam serum (Zenzes, 2000; Wood, Gibson PG, Myles DG, 2003).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar MDA adalah inflamasi, sinar ultraviolet, stres psikoemosional, bahan-bahan kimia, kelainan genetik dan asap rokok (Arck, Overall, K Spatz dkk., 2006). Paparan nikotin pada penelitian ini adalah salah satu komponen dari asap rokok yang dapat meningkatkan stres oksidatif/kadar MDA.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Niedernhofer dkk (2003). Penelitian tersebut menyatakan bahwa semakin banyak proses peroksidasi lipid, kadar MDA makin tinggi dan mutasi genetik yang terjadi pada DNA juga semakin banyak (Niedernhofer, Daniels, Rouzer, dkk, 2003). Proses peroksidasi lipid yang dimaksud pada penelitian ini adalah hasil stres oksidatif dari paparan nikotin.

Setelah dilakukan uji lanjut untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda nyata, maka hasil statistik yang didapatkan kelompok yang berbeda nyata adalah K1 dan K0, K1 dan K2, K1 dan K3, K2 dan K0. Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan nikotin memiliki kadar MDA serum yang lebih rendah dan berbeda nyata dengan kelompok perlakuan K1 dan K2. Keadaan ini disebabkan oleh kelompok K1 dan K2 adalah kelompok dengan dosis nikotin yang cukup besar sehingga kadar MDA serum yang dihasilkan juga tinggi.

K3 dan K0 tidak berbeda nyata karena K3 adalah kelompok yang diberikan nikotin dosis rendah, dengan demikian kadar MDA serum yang dihasilkan juga rendah akibat stres oksidatif yang belum terlalu berat.

K1 dan K2 serta K1 dan K3 berbeda nyata karena K1 adalah kelompok dengan dosis nikotin yang paling tinggi, sehingga kadar MDA serum yang dihasilkan berbeda dengan kelompok perlakuan lain yang dosis nikotinnya lebih rendah. K2 dan K3 tidak berbeda nyata karena kedua kelompok tersebut hanya diberikan nikotin dosis menengah dan rendah sehingga stres oksidatif akibat paparan nikotin yang digambarkan dengan kadar MDA serum tidak bermakna.

Dosis nikotin yang dapat meningkatkan kadar MDA serum *Rattus novergicus* adalah dosis menengah (52,5 mg/kgBB).

## 6.2 Efek Nikotin terhadap Keberhasilan Fertilisasi *Invitro*

Data keberhasilan fertilisasi *invitro* dari Tabel 5.2 menunjukkan bahwa semakin besar dosis nikotin yang diberikan, maka jumlah sel telur yang keluar semakin sedikit. Fertilisasi *invitro* yang dilakukan dari semua sel telur yang keluar adalah berhasil 100%, tidak ada kegagalan fertilisasi. Keberhasilan fertilisasi ditunjukkan dengan adanya badan polar II (lampiran 8).

Badan polar II dibentuk setelah terjadi pertemuan antara sel telur dan spermatozoa yang melakukan proses fertilisasi. Proses fertilisasi dikatakan berhasil jika terjadi miosis sel yang berlangsung secara komplit, sehingga menghasilkan badan polar II dan pronukleus (Saling, 1996).

Keberhasilan fertilisasi dari sel telur tikus yang dipapar nikotin disebabkan oleh paparan nikotin dengan dosis dan lama paparan yang diberikan pada penelitian ini, masuk ke dalam tubuh *Rattus novergicus* sebagai hewan coba, hanya dapat mempengaruhi jumlah sel telur yang keluar (ovulasi), tapi belum menyebabkan kegagalan fertilisasi. Dosis nikotin yang dipaparkan semakin besar maka jumlah sel telur yang dikeluarkan semakin sedikit (Tabel 5.2). Keberhasilan fertilisasi tersebut menunjukkan belum adanya kerusakan DNA dan zona pelusida dari sel telur sehingga masih dapat dibuahi oleh sperma tikus jantan.

Nikotin sebagai senyawa pro-oksidan dapat menyebabkan gangguan folikulogenesis, sehingga folikel dominan yang diperlukan untuk ovulasi tidak terbentuk. Nikotin sebagai senyawa oksidan akan memicu terjadinya apoptosis

pada sel granulosa folikel. Apoptosis yang terjadi menyebabkan folikel tersebut menjadi atresia, sehingga terjadi gangguan folikulogenesis yang digambarkan dengan sedikitnya jumlah folikel dominan yang terbentuk (Bordel, Laschke, Menger, dkk. 2006). Folikel dominan yang terbentuk sedikit, maka jumlah sel telur yang dikeluarkan juga sedikit, akibatnya adalah jumlah sel telur yang keluar saat ovulasi pada *Rattus novergicus* yang dipapar nikotin tidak sebanyak sel telur *Rattus novergicus* yang tidak dipapar nikotin.

Penelitian ini menggunakan dosis nikotin 70, 52.5, dan 35 mg/kgBB dan lama paparan nikotin selama 7 hari ternyata belum dapat merusak zona pellusida. Penelitian terdahulu tentang nikotin terhadap fertilisasi yang pernah dilakukan adalah pada manusia, yang menunjukkan bahwa nikotin dapat mempengaruhi fertilisasi pada manusia. Penelitian Cohen (2005) menunjukkan bahwa pasangan laki-laki dan perempuan yang mengalami infertil terjadi setelah mengkonsumsi rokok selama lebih dari 5 tahun. Rokok yang dikonsumsi tersebut mengandung nikotin dengan kadar 0,8 hingga 1,8 mg per batang tergantung merek dan ukuran rokok. Sebesar 1 mg nikotin dapat terserap dalam tubuh saat merokok satu batang. Jensen, Henriksen, Hjollund dkk (1998) juga melakukan penelitian pada studi populasi menjelaskan wanita yang merokok aktif maupun pasif akan cenderung memiliki angka fekunditas yang rendah dibandingkan dengan wanita yang tidak terpapar asap rokok.

### **6.3 Hubungan Kadar MDA Serum terhadap Keberhasilan Fertilisasi *Invitro***

Kadar MDA serum yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis nikotin tidak mempengaruhi kegagalan fertilisasi karena semua sel telur yang

keluar berhasil difertilisasi. Kadar MDA serum akibat paparan nikotin pada penelitian ini hanya mempengaruhi jumlah sel telur yang dikeluarkan. Semakin tinggi kadar MDA serum maka jumlah sel telur yang keluar akan semakin sedikit (Tabel 5.2). stres oksidatif yang terjadi belum dapat mempengaruhi kerusakan zona pellusida sehingga fertilisasi yang terjadi masih dapat berlangsung dengan baik.

Nikotin yang dipaparkan pada *Rattus novvergicus* ini menyebabkan terjadi stres oksidatif yang ditandai dengan meningkatnya kadar MDA serum. Dosis nikotin yang semakin banyak pada paparan kelompok tertentu menyebabkan kadar MDA serumnya juga meningkat. Hal tersebut menandakan tingginya stres oksidatif yang berlangsung di dalam tubuh hewan coba. Stres oksidatif tersebut mempengaruhi folikulogenesis dengan menghambat proses pembentukan folikel dominan yang diperlukan untuk ovulasi. Hambatan folikulogenesis terjadi akibat stres oksidatif menimbulkan apoptosis sel granulosis, sehingga folikelnya menjadi atresia. Karena terjadi atresia, maka tidak terbentuk folikel dominan, yang ditandai dengan sedikitnya jumlah sel telur yang keluar saat ovulasi (Bordel, Laschke, Menger, dkk., 2006).

Karena seluruh sel telur berhasil difertilisasi oleh spermatozoa, maka kadar MDA serum tidak dapat dikorelasikan dengan keberhasilan fertilisasi. Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian Agarwal, Gupta, Sekhon, dkk., (2008) yang menyatakan bahwa reaksi oksidatif yang berlangsung di dalam tubuh akan menimbulkan kelainan pada sistem reproduksi wanita hingga tingkat sel. Kadar senyawa oksidan yang tinggi akan mengganggu fertilisasi sel telur. Nikotin sebagai senyawa oksidan sebenarnya memiliki efek yang sama terhadap fertilisasi,

tapi pada penelitian ini belum terbukti. Hasil penelitian didapatkan efek nikotin terhadap peningkatan kadar MDA serum tetapi tidak mengganggu keberhasilan fertilisasi, yang diduga adanya komponen zona pellusida yang masih dapat bertahan untuk melindungi sel telur sehingga tidak rusak dan tetap berhasil melakukan fertilisasi.

BAB 7  
PENUTUP



### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah:

1. Terdapat perbedaan kadar MDA serum pada *Rattus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin dan tanpa diberi nikotin.
2. Tidak terdapat perbedaan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Rattus novergicus* yang mendapatkan injeksi nikotin dan tanpa diberi nikotin.
3. Tidak terdapat pengaruh antara kadar MDA serum terhadap keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Rattus novergicus*.

### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, maka peneliti menyarankan antara lain :

1. Bagi peneliti yang ingin mendalami pengaruh nikotin terhadap kadar MDA serum dan keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada *Rattus novergicus*, kiranya perlu dicari faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi keutuhan zona pellusida sehingga zona pellusida tidak mengalami kerusakan akibat stres oksidatif dan fertilisasi dapat terjadi pada semua sel telur, tetapi meningkatnya kadar MDA serum dapat menurunkan jumlah sel telur yang diovulasi.
2. Pemberian nikotin injeksi dosis terendah pada hewan coba *Rattus novergicus* yang dapat mempengaruhi stress oksidatif secara sistemik adalah dosis 52.5 mg/kgBB sebagai dosis terendah.



## DAFTAR PUSTAKA

- Arck PC, R Overall, K Spatz, C Liezman, B Handjiski, BF Klapp, MA Birch-Machin, and Peters EMJ, 2006. Towards a "free radical theory of graying": melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage. *The FASEB Journal* 20: E908-920.
- Agarwal A, S Gupta, L Sekhon, and R Shah, 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.
- Anonymous, 2009. *Infertilitas pasutri* (1). <http://muslimah.or.id/kesehatan-muslimah/infertilitas-pasutri-1.html>
- Augood C, K Duckitt, and AA Templeton, 1998. Smoking and female infertility : A systematic review and meta analysis. *Human Reproduction* 13 (6): 1532-1539.
- Bordel R, MW Laschke, MD Menger, and B Volmar, 2006. Nicotine does not effect vascularization but inhibit growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Human Reproduction* 21 (3): 610-616.
- Chattopadhyay K, and BD Chattopadhyay, 2008. Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation and antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian J Med Res* 127: 571-576.
- Chen C, 2005, Effect of enviromental tobacco smoke on levels of urinary hormone markers. *Enviromental Heallth Perspectives* 113 (4): 412-416.
- Cohen HK, L Natarajan, R Marrs, and B Yee, 2005. Effect of female and male smoking on succes rates of IVF and gamete intra fallopian transfer. *Human Reproduction* 16 (7): 1382 – 1390.
- Conner SJ, L Lefievre, DC Huges, and CRL Barratt, 2005. Cracking the egg: increased the complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction* 20 (5): 1148-1152.
- Departemen Kesehatan RI dan WHO Indonesia, 2003. *Konsumsi tembakau dan prevalensi merokok di Indonesia*; 1 – 2.
- Fox RR, and CW Laird, 1970. *Sexual cycles in: reproduction and breeding technique for laboratory animals 3<sup>rd</sup> edition*. Philadelphia: Lea and Febiger, 115-117.

- Gilbert SF, 1988. *Developmental Biology Second Edition*. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Green DPL, 1997. Three dimensional structure of zona pellusida. *Reviews of Reproduction* 2: 147-156.
- Halliwell B, JMC Gutteridge, 1999. *Free radicals in biology and medicine, third edition*, New York : Oxford University press. 295:405-407.
- Hardjopranjoto, S. 1995. *Ilmu kemajiran pada ternak*, penebit laboratorium ilmu kemajiran jurusan reproduksi dan kebidanan, fakultas kedokteran hewan universitas airlangga surabaya. Hal 6172; 177-179; 299-300.
- Hukkanen J, P Jacob III, and NL Benowitz, 2006. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57 (1): 79-107.
- Jeffery BH, B Herbert, and PM Gerard, 1999. *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plant second edition*. Philadelphia: Taylor and Francis Ltd; 283.
- Jensen TK, Henriksen TB, Hjollund NHI, dkk. 1998. Adult and prenatal exposures to tobacco smoke as risk indicators of fertility among 430 Danish couples. *American Journal of Epidemiology* 148 (10): 992-996.
- Jimenez-Movilla M, Avilles M, Gomez-Torres MJ, dkk., 2004. Carbohydrate analysis of the zona pellusida and cortical granules of human oocyte by means of ultra structural citochemistry. *Human Reproduction* 19 (8): 1842-1855.
- Kusumawati D, 2004. *Bersahabat dengan hewan coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 9,50,68,73.
- Mailhes JB, D Young, D Caldito, and SN London, 2000. Sensitivity of mouse oocyte to nicotine-induced perturbation during oocyte meiotic maturation and aneuploidy in vivo and in vitro. *Molecular Human Reproduction* 6 (3): 232-237.
- Neal MS, et al. 2002, Folicle growth is inhibited by benzo-[a]-pyrene, at concentrations representative of human exposure, in an isolated rat folicle cultur assay. *Human Reproduction*; 22 (4) : 961 – 967.
- Niedernhofer LJ, JS Daniels, CA Rouzer, RE Greene, and LJ Marnett, 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (33): 31426-31433.
- Paszkowski T, RN Clarke, and MD Hornstein, 2002. Smoking induces oxidative stress inside graafian follicle. *Human Reproduction* 17 (4): 921-924.

- Poernomo BS, M Mafruchati, Widjiati, EM Luqman, ED Masithah, dan AT Mukti, 2004. *Penuntun embriologi*. Surabaya: Pustaka Melati; 79.
- Rankin T, and J Dean, 2000. The zona pellusida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Reviews of Reproduction* 5: 114-121.
- Rohen JW dan E Lutjen-Drekoll, 2008. *Embriologi fungsional edisi 2*. Jakarta: EGC.
- Saling PM, 1999. *Fertilization: Mammalian gamete interactions in reproductive endocrinology, surgery, and technology volume 1*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 404-417.
- Samsulhadi, 2007. *Skor infertilitas*. Divisi infertilitas endokrinologi reproduksi departemen obstetri dan ginekologi fakultas kedokteran Airlangga RSU Dr. Soetomo Surabaya.
- Shiloh H, RL Baratz, M Koifman, D Ishai, D Bidder, Z Wener-Meganzi, and M Dirnfeld, 2004. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocyte and embryos prior to transfer into uterine cavity. *Human Reproduction* 19 (1): 157-159.
- Speroff L, and MA Fritz, 2005. *Clinical gynecologic endocrinology and fertility seventh edition book 1*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 241-246.
- Syahrin, H, Kamaludin, dan T Arjanto. 1994. *Reproduksi dan embriologi*. fakultas kedokteran universitas Indonesia. Jakarta, 11-20.
- Talbot P, BD Shur, and DG Myles, 2003. Cell Adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction* 68: 1-9.
- Wood LG, PG Gibson, and ML Garg, 2003. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J*. 21: 177-186.
- Wright KP, JR Trimenchi, J Allsworth, and D Keefe, 2006, The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Human Reproduction* 21 (11): 2930 – 2934.
- Zenzes MT, 2000. Smoking and reproduction: Gene damage to human gametes and embryos. *Human Reproduction* 6 (2): 122-131.

**Lampiran 1****Prosedur Pembuatan Larutan Nikotin**

Cara pembuatan larutan dengan dosis 35 mg/kgBB dengan bahan nikotin yang berbentuk cair dengan kemurnian 70%.

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

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

Dosis 35 mg/kgBB, akan disuntikkan 2 ml/100 gr BB = 20 ml/kgBB (10 g ~ 0,2 ml), 1 kg (1000 gr) ~ 10 ml; 1000 g/10 g x 0,2 ml = 20 ml; artinya dalam 20 ml larutan mengandung 35 mg nikotin maka:

$$35 \text{ mg/kgBB} = 0,035 \text{ gr}$$

$$= 0,035 / 1,008$$

$$= 0,03472 \text{ ml}$$

Karena nikotin yang tersedia kemurnian 70% maka harus diambil:

$$= 0,03472 \text{ ml} \times 100/70$$

$$= 0,0496 \text{ ml}$$

$$= 49,96 \mu\text{l}$$

$$= 50 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat 1 ml larutan dosis 35 mg/kgBB dengan cara mengambil 50  $\mu\text{l}$  larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidestilata hingga mencapai volume 1 ml. Jumlah yang disuntikkan adalah 0,1 ml.

Volume nikotin yang dibuat adalah = 7 hari x 0,1 ml x 10 ekor = 7 ml

Untuk dosis 52,5 mg/kgBB :

$$\begin{aligned} 52,5 \text{ mg/kgBB} &= 0,0525 \text{ gr} = 52,5/1,008 \\ &= 0,05208 \text{ ml} \\ &= 52 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Karena nikotin yang tersedia kemurnian 70% maka harus diambil :

$$\begin{aligned} &= 52 \mu\text{l} \times 100/70 \\ &= 74,3 \mu\text{l} \\ &= 74 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 1 ml larutan dosis 52,5 mg/kgB dengan cara mengambil 74  $\mu\text{l}$  larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidstilata hingga mencapai volume 1 ml. Jumlah yang disuntikkan adalah 0,1 ml.

Volume nikotin yang dibuat adalah = 7 hari x 0,1 ml x 10 ekor = 7 ml

Pembuatan larutan nikotin adalah dengan mengambil 7 x 74  $\mu\text{l}$  nikotin murni diencerkan dengan aquabidest hingga 7 ml.

Untuk dosis 70 mg/kgBB = 2 x dosis 35 mg/kgBB

$$\begin{aligned} &= 2 \times 50 \mu\text{l} \\ &= 100 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat 1 ml larutan dosis 70 mg/kgB dengan cara mengambil 100  $\mu\text{l}$  larutan nikotin murni, kemudian ditambahkan akuabidestilata hingga mencapai volume 1 ml. Jumlah yang disuntikkan 0,1 ml.

Volume nikotin yang dibuat adalah = 7 hari x 0,1 ml x 10 ekor = 7 ml

Pembuatan larutan nikotin adalah dengan mengambil 7 x 100  $\mu\text{l}$  nikotin murni diencerkan dengan aquabidest hingga / ml.

## Lampiran 2 Hasil Uji Normalitas

## NPar Tests

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		mda
N		35
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	4.7463
	Std. Deviation	1.78065
Most Extreme Differences	Absolute	.126
	Positive	.126
	Negative	-.101
Kolmogorov-Smirnov Z		.748
Asymp. Sig. (2-tailed)		.631

a. Test distribution is Normal.

**Lampiran 3 Hasil Uji Homogenitas****Test of Homogeneity of Variances**

mda

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.042	3	31	.128

Lampiran 4 Hasil Uji *One Way Anova*

Oneway

Descriptives								
mda	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1	9		
2	9	6.6422	1.15713	.38571	5.7528	7.5317	5.58	9.22
3	9	5.1189	1.86536	.62179	3.6850	6.5527	3.82	9.96
4	8	4.3112	.47206	.16690	3.9166	4.7059	3.69	5.17
Total	35	4.7463	1.78065	.30099	4.1346	5.3580	2.47	9.96

ANOVA					
mda	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66.987	3	22.329	16.958	.000
Within Groups	40.818	31	1.317		
Total	107.805	34			



Lampiran 5 Hasil Uji BNT

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:mda

	(I) kelomp ok	(J) kelomp ok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
						Tukey HSD	
	0	1	-3.77778*	.54093	.000	-5.2459	-2.3097
		2	-2.25444*	.54093	.001	-3.7226	-.7863
		3	-1.44681	.55758	.065	-2.9601	.0665
	1	0	3.77778*	.54093	.000	2.3097	5.2459
		2	1.52333*	.54093	.040	.0552	2.9915
		3	2.33097*	.55758	.001	.8177	3.8443
	2	0	2.25444*	.54093	.001	.7863	3.7226
		1	-1.52333*	.54093	.040	-2.9915	-.0552
		3	.80764	.55758	.480	-.7057	2.3209
	3	0	1.44681	.55758	.065	-.0665	2.9601
		1	-2.33097*	.55758	.001	-3.8443	-.8177
		2	-.80764	.55758	.480	-2.3209	.7057
Bonferroni							
	0	1	-3.77778*	.54093	.000	-5.3023	-2.2533
		2	-2.25444*	.54093	.001	-3.7789	-.7299
		3	-1.44681	.55758	.086	-3.0182	.1246
	1	0	3.77778*	.54093	.000	2.2533	5.3023
		2	1.52333	.54093	.050	-.0012	3.0478
		3	2.33097*	.55758	.001	.7596	3.9024
	2	0	2.25444*	.54093	.001	.7299	3.7789
		1	-1.52333	.54093	.050	-3.0478	.0012
		3	.80764	.55758	.945	-.7638	2.3791
	3	0	1.44681	.55758	.086	-.1246	3.0182
		1	-2.33097*	.55758	.001	-3.9024	-.7596
		2	-.80764	.55758	.945	-2.3791	.7638

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

## Lampiran 6 Hasil uji Homogenous Subset

### Homogeneous Subsets

		Mda			
kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	1	9	2.8644		
	4	8	4.3112	4.3112	
	3	9		5.1189	
	2	9			6.6422
Sig.			.060	.467	1.000

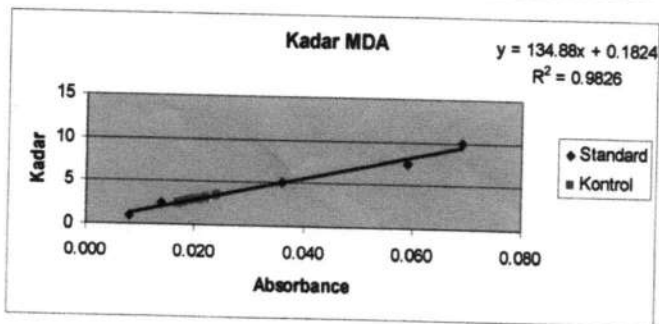
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.727.

### Lampiran 7 Hasil pengamatan pengukuran MDA serum

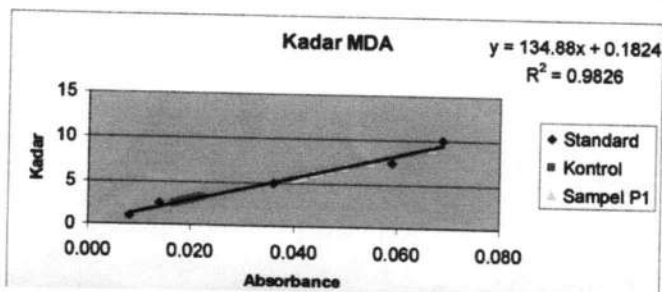
Tabel Hasil Pengamatan pengukuran absorbansi untuk kurva kontrol MDA (dengan aquadest)

Sampel	Absorbance	Kadar MDA
Ko 1	0.020	2.880
Ko 2	0.018	2.610
Ko 3	0.022	3.150
Ko 4	0.021	3.015
Ko 5	0.017	2.475
Ko 6	0.018	2.610
Ko 7	0.019	2.745
Ko 8	0.024	3.420
Ko 9	0.020	2.880



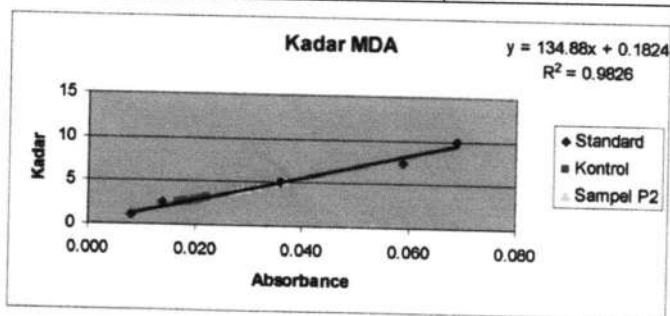
Tabel hasil pengamatan pengukuran absorbansi untuk kurva sampel MDA pertama (dosis nikotin 70 mg/kgBB)

Sampel	Absorbance	Kadar MDA
K1 1	0.047	6.522
K1 2	0.040	5.578
K1 3	0.044	6.117
K1 4	0.042	5.847
K1 5	0.067	9.219
K1 6	0.041	5.712
K1 7	0.050	6.926
K1 8	0.055	7.601
K1 9	0.045	6.252



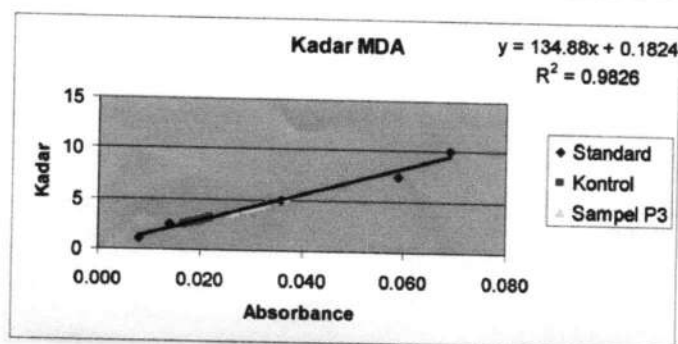
Tabel hasil pengamatan pengukuran absorbansi untuk kurva sampel MDA kedua (dosis nikotin 52.5 mg/kgBB)

Sampel	Absorbance	Kadar MDA
K2 1	0.035	4.903
K2 2	0.032	4.499
K2 3	0.035	4.903
K2 4	0.027	3.824
K2 5	0.030	4.229
K2 6	0.029	4.094
K2 7	0.037	5.173
K2 8	0.032	4.499
K2 9	0.028	3.959

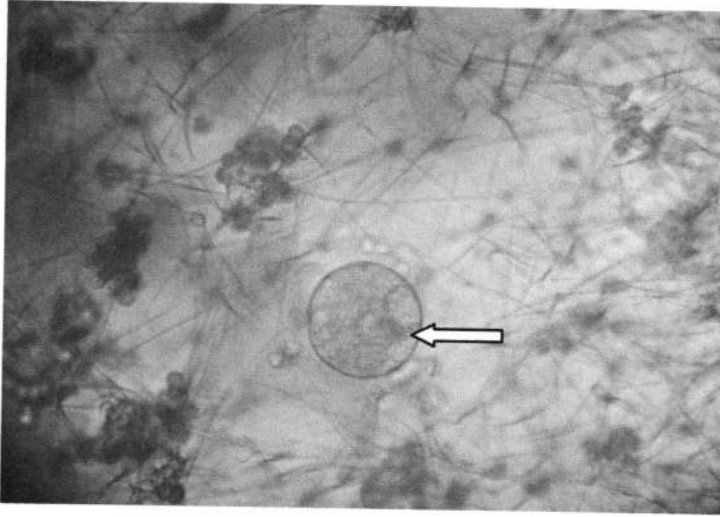


Tabel hasil pengamatan pengukuran absorbansi untuk kurva sampel MDA ketiga (dosis nikotin 35 mg/kgBB)

Sampel	Absorbance	Kadar MDA
K3 1	0.032	4.499
K3 2	0.033	4.633
K3 3	0.027	3.824
K3 4	0.030	4.229
K3 5	0.037	5.173
K3 6	0.031	4.364
K3 7	0.026	3.689
K3 8	0.029	4.094



**Lampiran 8** Gambaran ovum yang berhasil dibuahi sperma  
(tampak badan polar II)





**KOMISI ETIK PENELITIAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
" ETHICAL CLEARANCE "**

**No : 085-KE**

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

**PENELITIAN BERJUDUL** : Pengaruh Nikotin Terhadap Kadar Malonilaldehid  
(MDA) Serum dan Keberhasilan Fertilisasi In Vitro  
Pada *Rattus novergicus*

**PENELITI UTAMA** : Sumiati, S.kep. NS

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT  
PENELITIAN** : Program Pendidikan S3 Pasca Sarjana  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Surabaya, 6 April 2010

Mengetahui,  
Dekan FKH-Unair,

Ketua,

Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.  
NIP. 130687305

Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.  
NIP. 132014464