

**TESIS**

**EFEK PEMBERIAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG)  
TERHADAP AKTIVITAS OVARIUM DAN EKSPRESI  
RESEPTOR LH DI OVARIUM TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) BETINA**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



**Oleh :**

**DESI WULANSARI**  
**NIM 061041008**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**

**EFEK PEMBERIAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG)  
TERHADAP AKTIVITAS OVARIUM DAN EKSPRESI  
RESEPTOR LH DI OVARIUM TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) BETINA**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Surabaya

DESI WULANSARI  
061041008

PROGRAM STUDI MAGISTER  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal : 09 Oktober 2012

Oleh

Pembimbing Ketua,



Prof. Dr. Wurlina, Drh., M.S.

NIP. 19510606197803004

Pembimbing,

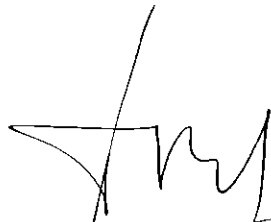


Dr. Sri Pantja Madyawati, Drh., M.Si.

NIP. 196310021989032003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina, Drh., M.S.

NIP. 19510606197803004

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul:

**EFEK PEMBERIAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG)  
TERHADAP AKTIVITAS OVARIUM DAN EKSPRESI  
RESEPTOR LH DI OVARIUM TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) BETINA**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan maupun gelar magister di suatu perguruan tinggi dan sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Oktober 2012



Desi Wulansari  
Nim. 061041008

Telah diuji pada

Tanggal : 09 Oktober 2012

KOMISI PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Pudji Srianto, Drh., M.Kes.

Anggota : Dr. Widjiati, Drh., M.Si.

Dr. Rimayanti, Drh., M.Kes.

Prof. Dr. Wurlina, Drh., M.S.

Dr. Sri Pantja Madyawati, Drh., M.Si.

Surabaya, 12 Oktober 2012

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D.  
NIP. 195312161978062001



## RINGKASAN

### **EFEK PEMBERIAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) TERHADAP AKTIVITAS OVARIUM DAN EKSPRESI RESEPTOR LH DI OVARIUM TIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA**

**Desi Wulansari**

Teh hijau (*Camellia sinensis*) diketahui memiliki berbagai khasiat bagi kesehatan diantaranya sebagai antioksidan, menurunkan berat badan, sebagai bahan kemoterapi pencegah kanker, mampu menghambat pertumbuhan sel tumor, memiliki aktivitas antitumor dan anti-inflamasi. Disamping manfaat tersebut, ternyata zat aktif teh hijau dapat menyebabkan hambatan produksi hormonal pada reproduksi jantan maupun betina. *Epigallocatechin gallate* (EGCG) yang terkandung dalam teh hijau dapat menurunkan kadar LH dalam serum.

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efek pemberian EGCG terhadap kadar LH dalam serum sudah pernah dilakukan sebelumnya namun penelitian untuk mengetahui pengaruh EGCG terhadap aktivitas ovarium dan ekspresi reseptor LH dengan metode immunohistokimia belum pernah dilakukan sebelumnya.

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorik, dengan empat kelompok perlakuan dan enam kali ulangan yang menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dengan umur 2-3 bulan, berat badan 100-150 gram sebagai hewan coba penelitian. Penelitian ini dimulai dengan melakukan swab vagina untuk menentukan fase birahi. Selanjutnya dilakukan randomisasi pada empat kelompok yaitu kontrol, dosis 4,05mg/ 100g, dosis 8,1mg/ 100g dan dosis 12,15mg/ 100g. Pemberian EGCG dilakukan menggunakan sonde sebanyak 1 ml selama tujuh hari. Pemeriksaan aktivitas ovarium ditentukan dengan swab vagina untuk mengetahui fase luteal dan folikuler. Swab vagina dilakukan tiap 24 jam selama tujuh hari. Tikus dikorbankan untuk diambil sampel ovarium pada hari ke delapan. Dilakukan pembuatan preparat histologis dan pemeriksaan ekspresi reseptor LH dari sampel ovarium yang diperoleh.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok yang disusun untuk mengetahui pengaruh EGCG terhadap aktivitas ovarium (panjang fase folikuler) dan ekspresi reseptor LH. Panjang fase folikuler dalam bentuk prosentase dianalisis secara deskriptif. Ekspresi reseptor LH dihitung menurut IRS semikuantitatif lalu diuji dengan Kruskal Wallis kemudian diuji lanjut dengan Mann Whitney antar perlakuan masing-masing.

Pemberian EGCG ternyata memperpanjang fase folikuler hingga 44,4% dari kontrol. Hasil ekspresi reseptor LH antara kelompok yang tidak diberi EGCG (kontrol) dengan pemberian EGCG menunjukkan hasil yang signifikan. Hal ini menunjukkan EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH. Penurunan ekspresi reseptor LH sudah cukup signifikan pada pemberian EGCG dosis 4,05 mg/ 100g dan pada dosis yang sama mampu memperpanjang fase folikuler hingga 44,4%.

Kesimpulan penelitian ini adalah bahwa Pemberian EGCG dapat mempengaruhi aktivitas ovarium dengan memperpanjang fase folikuler hingga 44,4%. Pemberian EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus betina (*Rattus norvegicus*). Dosis efektif pemberian EGCG dalam menurunkan ekspresi reseptor LH adalah 40,5 mg/kg BB pada tikus.

Penelitian ini merupakan laporan penelitian eksperimental laboratorik untuk mengetahui efek pemberian EGCG terhadap sistem endokrin reproduksi dengan mengetahui aktivitas ovarium dan ekspresi reseptor LH. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme molekuler yang terjadi akibat pemberian EGCG terhadap mekanisme hormonal yang berpengaruh terhadap reproduksi.

**THE EFFECT OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG)  
TO OVARY ACTIVITY AND THE EXPRESSION OF LH  
RECEPTORS IN FEMALE RAT (*Rattus norvegicus*)**

Desi Wulansari

**ABSTRACT**

Green tea polyphenol, epigallocatechin gallate (EGCG) has been proposing as a cancer chemopreventive, antioxidant and has inhibitor effect in steroidogenesis. Three groups rat (*Rattus norvegicus*) were treated with 4,05; 8,1 and 12,15 mg EGCG/ 100 g PO in seven days to study their acute effect on ovary activity and the expression of LH receptors. Vagina smear histology has been used as an index of ovarian activity. Daily vagina smears were taken for six days. The expression of LH receptors were examined by immunohistochemistry avidin-biotin complex methode. The result showed that EGCG significantly, reduced the expression of LH receptors and extended follicular phase up to 44,4%. Theca cells showed receptor for LH, has been released from anterior pituitary. After binding to its receptor, LH signals theca cells increased transcription of genes encoding the enzymes necessary to convert cholesterol to androgens (androstenedione and testosterone). Inhibiting effect on LH receptor caused reducing production steroidogenesis catalyzed enzymes, inhibiting ovulation and follicular growth. The expression of LH receptors were reduced significantly in 4,05mg/ 100 g BW EGCG in rat.

**Keywords:** green tea, *Rattus norvegicus*, EGCG, ovary activity, expression LH receptor



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan Tesis dengan judul :

**EFEK PEMBERIAN EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG)  
TERHADAP AKTIVITAS OVARIUM DAN EKSPRESI  
RESEPTOR LH DI OVARIUM TIKUS  
(*Rattus norvegicus*) BETINA**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., Ph.D. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Wurlina, Drh., M.S. selaku Ketua Prodi Program Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi sekaligus dosen pembimbing utama. Dr. Sri Pantja Madyawati, Drh., M.Si. selaku pembimbing serta. Terima kasih atas waktu, perhatian, nasihat, saran dan bimbingannya selama penulisan Tesis ini.

Kepada dosen penguji Tesis Prof. Dr. Pudji Srianto, Drh., M.Kes., Dr. Widjiati, Drh., M.Si. dan Dr. Rimayanti, Drh., M.Kes. Terima kasih atas masukan, nasehat serta saran untuk penelitian dan penulisan Tesis.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Dr. Widjiati, Drh., M.Si. atas segala bantuan teknis, fasilitas dan bimbingan dalam melaksanakan penelitian dan penulisan Tesis.

Terima kasih juga penulis ingin ucapkan kepada Dr. Hani Plumeriastuti, Drh., M.Kes., beserta para staf Laboratorium Patologi Veteriner dan Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, atas bantuan teknis dalam proses penelitian ini. Terima kasih kepada staf Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang atas bantuan dan kerjasama teknis dalam proses penelitian ini.

Terima kasih kepada Dr. Soeharsono, Drh. M.Si. dan Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, Drh. M.S. atas bantuan, masukan dan saran dalam pengolahan data dan penulisan Tesis ini. Terima kasih kepada seluruh dosen pengajar baik S1, profesi dan S2 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Seluruh guru SMAN 1 Sidoarjo, SLTPN 3 Sidoarjo dan SDN Pucang Anom Sidoarjo.

Segala hormat dan terima kasih sebesar-besarnya penulis haturkan kepada Ibunda Ainul Anisah, Bapak Salem Agama, adikku Ainsyal Febrian Agama dan adikku Ramdhan Hardiansyah Agama. Kepada keluarga besar yang senantiasa mendukung dan mendoakan: M. Yasin, Hanifah, Suparto, Siti Tarwiyah, Alfiah, Alifah, Suharsono, Sugeng Utomo, Khoiron, Nina Hertina.

Serta terima kasih kepada Wahidul Qohar, Taufan Novenda Nallia, Indira Mauluddiyah, Drh., Rossy Agnes Sufiana Putri dan Magoet Wara Hastuti. Kepada teman-teman S2-Ilmu Biologi Reproduksi yang banyak membantu penelitian ini Aris Juliprihanto, Drh., Viski F. Hendrawan, Drh., Wahyu Hergiyanto, Drh., Theresia Audita Guretti, Drh., Donny Susanto, Drh., serta semua pihak yang membantu terselesaikannya Tesis ini.

Surabaya, Oktober 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
RINGKASAN.....	v
ABSTRACT.....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat.....	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Teh Hijau ( <i>Camellia Sinensis</i> ).....	5
2.1.1 <i>Epigallocatechin gallate</i> (EGCG).....	6
2.2 Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	8
2.2.1 Organ Reproduksi Betina.....	9
2.2.2 Reproduksi dan Siklus Birahi Tikus.....	11
2.2.3 Ovarium.....	13
2.2.4 <i>Luteinizing Hormone</i> (LH).....	16
2.3 Immunohistokimia.....	20
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN..	22
3.1 Kerangka Konseptual.....	22
3.2 Hipotesa Penelitian.....	26
BAB 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	27
4.1 Jenis Rancangan Penelitian.....	27
4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel.....	28
4.2.1 Populasi.....	28
4.2.2 Sampel.....	28
4.2.3 Besar Sampel.....	29
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	29
4.3.1 Variabel Bebas.....	29
4.3.2 Variabel Tergantung.....	29
4.3.3 Variabel Kendali.....	30

4.3.4	Definisi Operasional Variabel.....	30
4.4	Bahan Penelitian.....	32
4.5	Peralatan Penelitian.....	32
4.6	Waktu dan Tempat Penelitian.....	33
4.7	Prosedur Penelitian.....	33
4.7.1	Prosedur Penentuan Aktivitas Ovarium dengan Swab Vagina.....	33
4.7.2	Prosedur Pemberian Epigallocatechin Gallate (EGCG)..	34
4.7.3	Prosedur Pengambilan Sampel.....	34
4.7.4	Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium.....	34
4.7.4	Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Reseptor LH.....	35
4.8	Analisis Data.....	35
4.9	Kerangka Operasional Penelitian.....	36
BAB 5.	HASIL PENELITIAN.....	37
5.1	Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Aktivitas Ovarium.....	37
5.2	Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Ekspresi Reseptor LH dengan Metode Immunohistokimia.....	39
BAB 6.	PEMBAHASAN.....	46
6.1	Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Aktivitas Ovarium.....	46
6.2	Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Ekspresi Reseptor LH..	47
BAB 7.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	50
7.1	Kesimpulan.....	50
7.2	Saran.....	50
	DAFTAR PUSTAKA.....	51
	LAMPIRAN.....	55

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Komposisi Teh Hijau.....	6
2.2	Sifat Fisika dan Kimia Catechin.....	7
2.3	Parameter Normal Fisiologi Reproduksi dan Biologi Tikus.....	11
5.1	Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Panjang Folikuler.....	37
5.2	Skala Semikuantitatif IRS Merupakan Hasil Perkalian Antara Skor Prosentase Sel Positif (A) dengan Skor Intensitas Reaksi Warna (B).....	40
5.3	Ekspresi Sel Imunoreaktif LH pada Ovarium Tikus.....	41
5.4	Uji Mann Whitney Hasil Ekspresi reseptor LH.....	44

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Siklus Birahi pada Tikus Terdiri Atas Fase Diestrus (a), Proestrus (b), Estrus (c) dan Metestrus (d).....	13
2.2	Struktur dan Morfologi Ovarium.....	14
2.3	Perubahan Morfologi Ovarium Tikus Selama Siklus Birahi..	15
2.4	Struktur Dinding Folikel.....	16
2.5	Regulasi Endokrin dalam Sistem Reproduksi.....	17
2.6	Konsep Dua Sel Dua Gonadotropin dalam Produksi Estrogen yang Berperan Mengatur Siklus Birahi.....	18
2.7	Profil Estrogen, Progesteron dan LH pada Siklus Birahi Tikus.....	19
2.8	Immunohistokimia Metode <i>Direct</i> dan <i>Indirect</i> .....	21
3.1	Skema Kerangka Konseptual.....	25
5.1	Grafik Pemberian EGCG terhadap Panjang Fase Folikuler...	38
5.2	Swab Vagina Fase Proestrus (P), Estrus (E), Metestrus (M) dan Diestrus (D).....	39
5.3	Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) pada kelompok kontrol.....	42
5.4	Pengaruh Pemberian EGCG dosis 4,05mg terhadap Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	42
5.5	Pengaruh Pemberian EGCG dosis 8,1 mg terhadap Ekspresi Reseptor LH (panah) di Ovarium Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	43
5.6	Pengaruh Pemberian EGCG dosis 12,15 mg terhadap Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	43



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium.....	55
2	Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Reseptor LH dengan Teknik Immunohistokimia.....	56
3	Penghitungan Dosis.....	57
4	Siklus Birahi Tikus antara Kontrol dan Pemberian EGCG dengan Berbagai Dosis.....	58
5	Ekspresi reseptor LH Dianalisis dengan Uji Kruskal Wallis.....	59
6	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P1 (dosis 4,05 mg/ 100 g).....	60
7	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g).....	61
8	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P3 (dosis 12,15 mg/ 100 g).....	62
9	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P1 (dosis 4,05 mg/ 100 g) dengan P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g).....	63
10	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P1 (dosis 4,05 mg/ 100g) dengan P3 (dosis 12,15 mg/ 100 g).....	64
11	Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g) dengan P3 (dosis 12,15 mg/100g).....	65
12	Dokumentasi Kegiatan.....	66

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

<b>Singkatan</b>	<b>Kepanjangan</b>
$\alpha$	Alfa
ACTH	Adenocorticosteroid Hormone
ATP	Adenosin Tri Phosphat
$\beta$	Beta
C	Catechin
$^{\circ}\text{C}$	Derajat celcius
cAMP	Cyclic Adenosin Mono Phosphat
cc	Cubic centimeters
CG	Catechin-gallate
CoA	Koenzim A
CYP450arom	Cytochrome P450 aromatase
CYP19A1	Cytochrome P19
CYP450scc	Cytocrome P450 cholesterol chain cleavage
CYP45017 $\alpha$	Cytocrome P450 17 $\alpha$ -Hidroksilase
CYP17A1	Cytocrome P450 20-Desmolase
DAB	Diamminobenzidine
DHEA	Dehidroepiandrosteron
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin-gallate
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-gallate
FSH	Follicle Stimulating Hormone
g	Gram
GC	Gallocatechin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogen Peroksida
Hg	Hydrargyricum
HSD3B	3 $\beta$ -Hidroksisteroid Dehidrogenase
HSD17 $\beta$	17 $\beta$ -Hidroksisteroid Dehidrogenase
ICSH	Interstitial Cell Stimulating Hormone
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
LH	Lutenizing Hormone
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
m <sup>3</sup>	Meterkubik
mm	Milimeter
ml	Mililiter
mg	Miligram
PBS	Phosphat Buffer Saline
pH	Power of Hidrogen
PGE2	Prostaglandin E2
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
%	Persen



**BAB 1**

**PENDAHULUAN**

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Teh hijau (*Camellia sinensis*) banyak dikonsumsi oleh sebagian masyarakat karena diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Teh hijau (*Camellia sinensis*) memiliki khasiat sebagai antioksidan, menurunkan berat badan, sebagai bahan kemoterapi pencegah kanker, mampu menghambat pertumbuhan sel tumor, memiliki aktivitas antitumor dan anti-inflamasi (Yang *et al.*, 2000; Morel *et al.*, 1993).

Disamping manfaat tersebut, ternyata zat aktif teh hijau juga memiliki efek antisteroidogenik yang menghambat produksi hormonal pada reproduksi jantan maupun betina. Dalam teh hijau terkandung lebih dari 36% polifenol. Polifenol memiliki tujuh macam bentuk *catechin* yang berbeda, yaitu: *Epigallocatechin-gallate* (EGCG), *Epigallocatechin* (EGC), *Epicatechin-gallate* (ECG), *Epicatechin* (EC), *Gallocatechin* (GC), *Catechin* (C), dan *Catechin-gallate* (CG) (Fulder, 2004).

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) merupakan *catechin* dari teh hijau dengan komposisi terbesar (Tuminah, 2004) yang diketahui dapat menurunkan kadar LH dalam serum hingga 40-50% pada tikus (Kao *et al.*, 2000; Figueiroa *et al.*, 2009). *Luteinizing hormon* (LH) memiliki peran penting dalam steroidogenesis. *Luteinizing hormon* (LH) disekresi oleh hipofisis anterior akan berikatan dengan reseptornya di sel theca. Sinyal LH meningkatkan transkripsi sejumlah gen yang mengkode sintesis enzim yang diperlukan untuk mengkonversi kolesterol menjadi androgen (androstenedion

dan testosteron) (Anwar, 2005). Testosteron dan androstenedion akan dikonversi menjadi estradiol-17 $\beta$  oleh enzim aromatase (CYP450arom, CYP19A1) dengan bantuan FSH di sel granulosa.

Estradiol-17 $\beta$  atau estrogen merupakan hormon yang penting dalam menentukan tanda birahi. Adanya gangguan pada mekanisme hormonal berpengaruh terhadap aktivitas ovarium sehingga menyebabkan terganggunya fase dan siklus birahi. Aktivitas ovarium terdiri atas dua fase yaitu fase luteal dan folikuler. Fase luteal pada hapusan vagina terdiri atas fase metestrus dan diestrus sedangkan fase folikuler terdiri atas fase proestrus dan estrus (Juwitasari dkk., 2008). Fase birahi dapat diketahui dengan mengamati bentuk sel hapusan vagina. Hapusan vagina merupakan metode yang cepat dan murah dalam menentukan fase birahi (Hill *et al.*, 2008).

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efek pemberian EGCG terhadap kadar LH dalam serum sudah pernah dilakukan oleh Kao *et al.* (2000) namun penelitian untuk mengetahui pengaruh EGCG terhadap aktivitas ovarium dan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina belum pernah dilakukan sebelumnya. Panjang fase folikuler dan ekspresi reseptor LH selanjutnya dibandingkan antara kontrol dan perlakuan untuk mengetahui efek pemberian EGCG. Perbedaan panjang fase folikuler dan ekspresi reseptor LH setelah pemberian EGCG menunjukkan bahwa bahan tersebut berpengaruh terhadap mekanisme hormonal pada organ reproduksi betina.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek pemberian EGCG terhadap aktivitas ovarium dan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas dapat diperoleh rumusan masalah:

1. Apakah pemberian berbagai dosis EGCG dapat memperpanjang fase folikuler pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina ?
2. Apakah pemberian berbagai dosis EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan bahwa teh hijau (EGCG) berpengaruh terhadap mekanisme hormonal pada organ reproduksi betina.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus dari penelitian ini antara lain:

1. Membuktikan bahwa pemberian berbagai dosis EGCG dapat memperpanjang fase folikuler pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina.
2. Membuktikan bahwa pemberian berbagai dosis EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina.



## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Sebagai informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian berbagai dosis EGCG terhadap aktivitas ovarium pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina.
2. Sebagai informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian berbagai dosis EGCG terhadap ekspresi reseptor LH tikus (*Rattus norvegicus*) betina.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Sebagai informasi mengenai efek teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap penurunan hormon reproduksi. Penggunaan teh hijau (*Camellia sinensis*) diharapkan mampu digunakan untuk bahan



**BAB 2**

**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Teh hijau *Camellia sinensis* umumnya tumbuh di daerah yang beriklim tropis dengan ketinggian antara 200-2000 meter di atas permukaan laut dengan suhu cuaca antara 14-25 °C. Pada umumnya teh sebagai bahan minuman dikelompokkan dalam tiga golongan, yaitu teh yang difermentasikan atau teh hitam (*black tea*), teh yang tidak difermentasikan atau teh hijau (*green tea*), dan teh yang setengah difermentasikan atau teh oolong (*oolong tea*). Proses fermentasi di atas pada dasarnya adalah proses oksidasi polifenol yang ada dalam daun teh oleh enzim polifenol oksidase (Fulder, 2004).

Teh hijau diproduksi dengan cara menginaktivasi enzim polifenol oksidase yang ada dalam pucuk daun teh segar, dengan cara pemanasan atau penguapan agar oksidasi enzimatik terhadap polifenol dapat dicegah, sehingga kandungan antioksidannya lebih besar dari pada teh hitam maupun teh oolong (Fulder, 2004).

Daun teh hijau mengandung senyawa aktif yang dipercaya bertanggung jawab dalam memberikan kontribusi positif bagi kesehatan, yaitu polifenol. Polifenol adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin E (Adeputri, 2002).

Dalam teh hijau terkandung lebih dari 36 persen polifenol, jumlah ini masih dipengaruhi cuaca (iklim), varietas, jenis tanah dan tingkat kemasakan. Polifenol memiliki tujuh macam bentuk *catechin* yang berbeda, yaitu: *Epigallocatechin-gallate* (EGCg), *Epigallocatechin* (EGC), *Epicatechin-gallate* (ECg), *Epicatechin* (EC), *Gallocatechin* (GC), *Catechin* (C), dan *Catechin-gallate* (Cg) (Fulder, 2004).

Tabel 2.1 Komposisi Teh Hijau

No.	Komponen	% Berat Kering
1	Kafein	7,43
2	(-) Epicatechin	1,98
3	(-) Epicatechin gallate	5,20
4	(-) Epigallocatechin	8,42
5	(-) Epigallocatechin gallate	20,29
6	Flavonol	2,23
7	Theanin	4,70
8	Asam glutamat	0,50
9	Asam aspartat	0,50
10	Arginin	0,74
11	Asam amino lain	0,74
12	Gula	6,68
13.	Potassium	3,96
14.	Bahan yang mengendapkan alkohol	12,13

Sumber: Tuminah, 2004

### 2.1.1 Epigallocatechin Gallate (EGCG)

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) merupakan bentuk *catechin* yang memiliki komposisi terbanyak pada daun teh hijau. Dalam polifenol, 10 sampai 50 persen dari seluruh kandungan *catechin* berasal

dari EGCG. Bahkan kebanyakan manfaat positif dari teh dan juga aktivitas antioksidan terkuat didapat dari EGCG dalam daun teh.

Tabel 2.2 Sifat Fisika dan Kimia *Catechin*

Sifat Fisika	Sifat Kimia
Warna putih Melting point : 104-106 <sup>0</sup> C Tekanan uap : 1 mmHg pada 75 <sup>0</sup> C Densitas uap : 3,8 g/m <sup>3</sup> Flash point : 137 <sup>0</sup> C Eksplasion limits : 1,97% (batas atas)	Sensitif terhadap oksigen. Sensitif terhadap cahaya (mengalami perubahan warna apabila kontak langsung dengan udara terbuka). Berfungsi sebagai antioksidan. Substansi yang dihindari unsur : oksigen, asam klorida, asam anhidrat, basa dan asam nitrat. Larut dalam air hangat. Stabil pada kondisi agak asam atau netral (pH optimum 4-8).

Sumber : Michael and Irene, 1997 dan Alamsyah 2006

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) memiliki banyak manfaat diantaranya dapat menekan pertumbuhan tumor payudara pada mencit (Liao *et al.*, 1995). Selain itu EGCG diketahui berpengaruh terhadap *intake* makanan yang menyebabkan terjadinya efek antigonadotropin sebagai efek sekunder (Kao *et al.*, 2000).

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) juga memiliki efek negatif terhadap performa reproduksi pada babi. Penelitian yang dilakukan oleh Basini *et al.* (2011) menunjukkan bahwa EGCG menghambat

proliferasi sel granulosa, produksi hormon testosteron dan estradiol-17 $\beta$  serta menghambat faktor angiogenetik (VEGF) pada sel granulosa.

Penurunan produksi estradiol-17 $\beta$  disebabkan karena EGCG memiliki aktivitas menghambat enzim aromatase. Enzim aromatase berfungsi untuk mengubah androstenedion dan testosteron dengan bantuan FSH menjadi estradiol-17  $\beta$  (Sato *et al.*, 2002).

## 2.2 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih atau rat (*Rattus sp.*) sering digunakan sebagai hewan percobaan atau hewan laboratorium karena pertimbangan ekonomis yaitu kemampuan hidup tikus hanya 2-3 tahun dengan lama produksi 1 tahun, mudah dipelihara dan murah (Malole dan Pramono, 1989). Penggunaan tikus dalam penelitian reproduksi dengan alasan panjang waktu siklus birahi yang pendek, yaitu 4-5 hari dan lama kebuntingannya hanya selama 21-23 hari (Malole dan Pramono, 1989). Tikus dinilai sangat menguntungkan karena merupakan hewan multipara yang mampu menghasilkan beberapa sel telur dalam satu siklus birahi serta dapat berkembangbiak dalam waktu singkat (Ungerer *et al.*, 1985). Sistem klasifikasi tikus putih menurut Ruedas (2008) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Phylum : Chordata  
Kelas : Mammalia  
Ordo : Rodentia  
Subordo : Sciurognathi  
Famili : Muridae



Subfamili : Murinae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus putih (Albino Normay rat, *Rattus norvegicus*) yang biasa digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium terdiri atas lima macam "basic stock" yaitu *Long Evans*, *Osborne Mendel*, *Sherman*, *Sprague Dawley*, dan *Wistar*. *Sprague Dawley* memiliki ciri-ciri berwarna albino putih, berkepala kecil, dan ekor lebih panjang daripada badannya. *Long Evans* memiliki ukuran badan lebih kecil daripada *Sprague Dawley* dengan warna yang gelap pada bagian atas kepala dan bagian depan tubuh. *Wistar* memiliki kepala yang besar dan ekornya lebih pendek (Baker *et al.*, 1979).

Tikus laboratorium pada umur empat minggu, beratnya 35-40 gram dan berat dewasa rata-rata 200-250 g, tetapi bervariasi tergantung pada galur. Tikus jantan tua dapat mencapai 500 g tetapi tikus betina jarang yang lebih dari 350 g. Galur yang paling besar ukuran tubuhnya adalah galur *Sprague Dawley*. Ada dua sifat yang membedakan tikus dari hewan percobaan lain, yaitu tikus tidak dapat muntah karena struktur anatominya yang tidak lazim di tempat esofagus bermuara ke dalam lambung dan tikus tidak mempunyai kantung empedu (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

### **2.2.1 Organ Reproduksi Betina**

Organ reproduksi betina terdiri dari organ reproduksi primer dan sekunder. Organ reproduksi primer yaitu ovarium yang menghasilkan sel telur dan hormon hormon kelamin betina. Umumnya ovarium terdapat dua buah, kanan dan kiri yang terletak di rongga

pelvis. Bentuk dan ukuran ovarium berbeda-beda menurut spesies dan fase siklus birahi. Organ reproduksi sekunder terdiri dari tuba fallopii, uterus, serviks, vagina, dan vulva. Fungsi organ reproduksi sekunder adalah menerima dan menyalurkan sel-sel kelamin jantan dan betina, memberi makan dan melahirkan individu baru (Toelihere, 1985).

Tuba fallopii merupakan saluran reproduksi betina dengan ukuran yang kecil, berliku-liku, kenyal dan jumlahnya sepasang. Tuba fallopii terikat pada penggantungnya yang disebut mesosalphink dan terbagi atas tiga bagian yaitu infundibulum dengan fimbrae, ampula dan isthmus. infundibulum merupakan bagian yang paling dekat dengan ovarium, berbentuk corong dengan tepi yang tidak teratur dan berjumbai yang disebut fimbrae (Ismudiono dkk., 2010).

Uterus adalah saluran reproduksi hewan betina yang diperlukan untuk penerimaan ovum yang telah dibuahi, nutrisi dan perlindungan fetus. Umumnya uterus hewan terdiri atas sebuah corpus uteri dan dua buah cornua serta sebuah servix. Uterus digantung oleh ligamentum lata atau mesometrium yang bertaut pada dinding ruang abdomen dan ruang pelvis. Uterus terbagi atas beberapa tipe diantaranya didelphia, dupleks, bicornua, bipartite dan simpleks. Tikus (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang uterusnya bertipe dupleks, yaitu uterus yang tidak memiliki corpus uteri, servixnya dua buah dan kedua cornuanya terpisah sama sekali (Ismudiono dkk., 2010).

### 2.2.2 Reproduksi dan Siklus Birahi Tikus

Pubertas pada tikus betina tergantung dari tingkat pertumbuhan dan kematangan oosit pada ovarium, sedangkan pada jantan ditandai dengan turunnya testes ke dalam scrotum dan terjadinya siklus spermatogenik. Tikus betina mencapai dewasa kelamin pada umur 50-72 hari dan vagina mulai terbuka pada umur 35-90 hari (Hafez, 2000). Tikus yang masih muda sudah dapat dibedakan antara jantan dan betina. Tikus jantan memiliki papila genitalia dan jarak anogenital yang lebih besar dari betina yaitu 5 mm pada umur 7 hari, sedangkan betina hanya berjarak 2,5 mm. Puting susu pada betina sudah terlihat sejak umur 8-15 hari (Malole dan Pramono, 1989).

Tabel 2.3 Parameter Normal Fisiologi Reproduksi dan Biologi Tikus

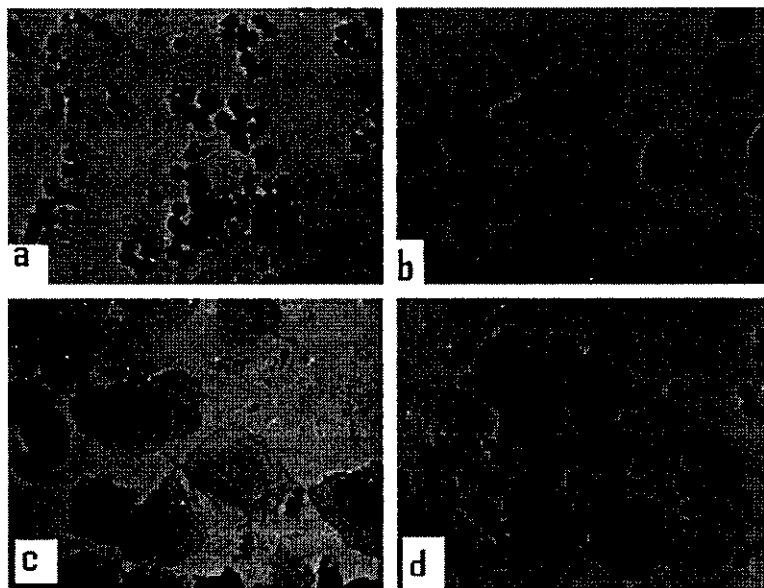
Kriteria	Nilai
Fase proestrus	12-20 jam
Fase estrus	9-20 jam
Fase metestrus	8-12 jam
Fase Diestrus	48-60 jam
Durasi total siklus	4-6 hari
Pubertas	6-8 minggu
Ovulasi	8-11 jam setelah estrus
Konsumsi pakan	10g pakan/ 100g BB/ hari

Sumber : Malole dan Pramono, 1989

Siklus birahi tikus berlangsung selama 4-6 hari dengan lama birahi rata-rata 12 jam setiap siklus dan birahi terjadi pada malam hari.

Birahi pada tikus betina banyak dipengaruhi oleh bau pejantan (Malole dan Pramono, 1989). Smith dan Mangkoewidjojo (1988) menyatakan, bahwa pada umumnya tikus mulai kawin pada umur 8-9 minggu, Masa birahi terbagi empat periode yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.

Periode siklus birahi tikus terdiri proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Proestrus berlangsung selama 12 jam, secara mikroskopis terlihat sel epitel berinti dari ulasan vagina yang dilakukan (Nuryadi, 2007). Estrus berlangsung selama 12 jam, secara mikroskopis terlihat sel yang mengalami kornifikasi (sel epitel mengalami penandukan dan seringkali intinya piknotik atau tanpa inti) dari ulas vagina (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Metestrus berlangsung selama 21 jam, secara mikroskopis terlihat banyak leukosit dan sedikit sel yang mengalami kornifikasi. Diestrus berlangsung selama 57 jam, secara mikroskopis ulasan vagina dipenuhi oleh leukosit (Nuryadi, 2007).



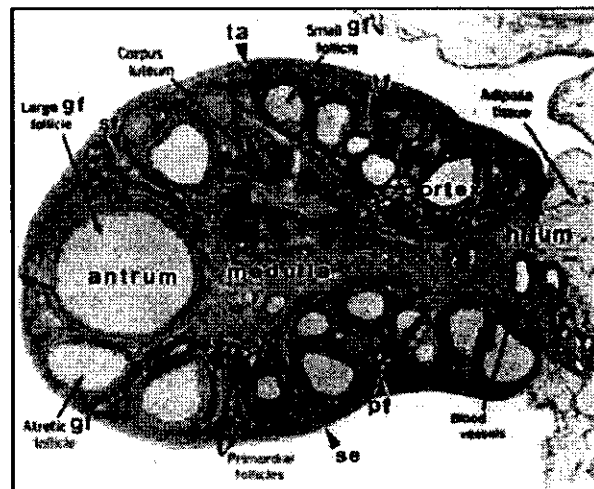
Gambar 2.1 Siklus Birahi pada Tikus Terdiri Atas Fase Diestrus (a), Proestrus (b), Estrus (c) dan Metestrus (d) (Sumber: Shrestha *et al.*, 2010).

Tikus merupakan hewan poliestrus yaitu dapat mengalami estrus lebih dari sekali dalam setahun. Terdapat estrus postpartum dalam waktu 48 jam sesudah partus. Akan tetapi tikus tidak dikawinkan dalam masa estrus postpartum supaya anak-anak yang sedang disusui tidak terlantar (Malole dan Pramono, 1989).

### 2.2.3 Ovarium

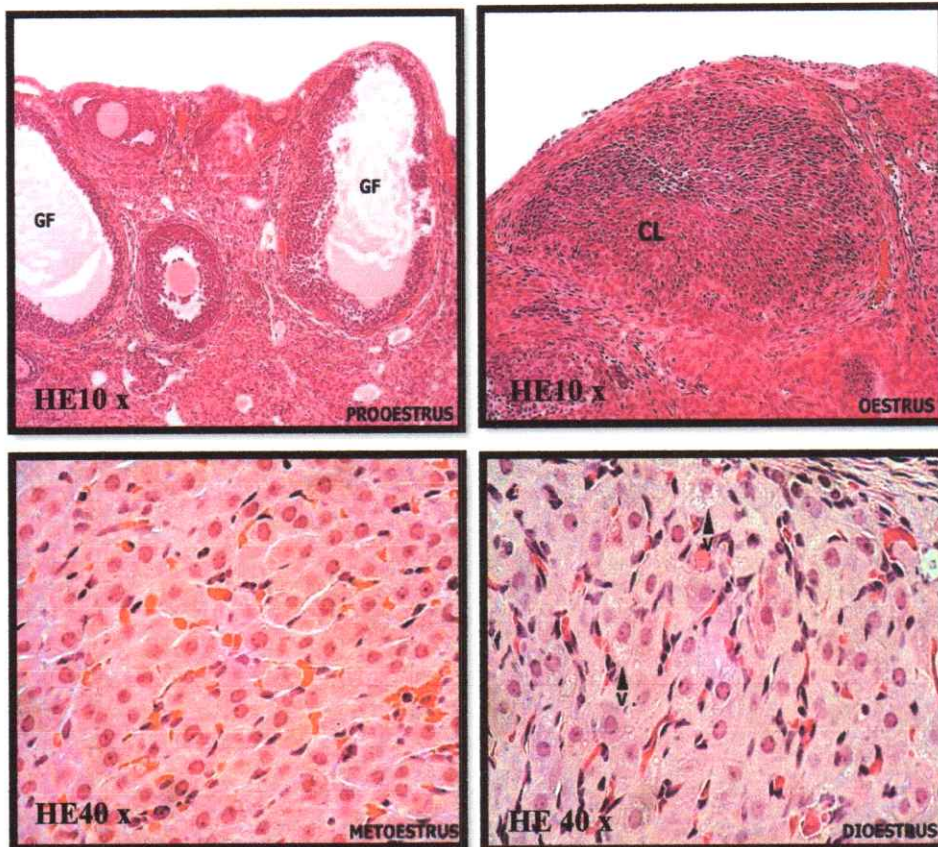
Ovarium adalah organ primer reproduksi pada betina. Ovarium mempunyai dua fungsi, sebagai organ yang menghasilkan sel telur atau ovum dan sebagai organ endokrin yang mensekresikan hormon-hormon kelamin betina, estrogen, dan progesteron (Toelihere, 1985). Ovarium dapat dianggap bersifat endokrin atau sitogenik karena

mampu menghasilkan hormon yang akan diserap langsung ke dalam peredaran darah dan juga ovum (Frandsen, 1992).



Gambar 2.2 Struktur dan Morfologi Ovarium (Sumber: Erickson, 2006).

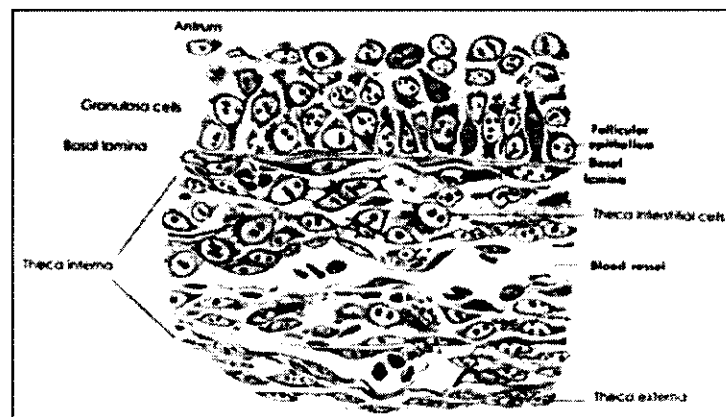
Pada mamalia, ovarium terdiri dari dua buah. Pada waktu pertumbuhan embrional, ovarium akan mengalami sedikit penurunan (*descensus ovarica*) ke arah kaudal menjelang dilahirkan. Ovarium mempunyai permukaan yang licin sebelum terjadinya ovulasi secara teratur dan mempunyai warna abu-abu sampai merah muda. Setelah mencapai masa remaja, permukaan ovarium menjadi tidak rata karena terbentuk banyak folikel yang baru maupun folikel yang telah dewasa.



Gambar 2.3 Perubahan Morfologi Ovarium Tikus Selama Siklus Birahi (Sumber: Anonim, 2012).

Disamping itu juga terdapat korpus luteum dan korpus albikan (Hardjopranjoto, 1995). Bentuk ovarium tersebut bervariasi tergantung kepada spesies hewan. Besar ovarium bertambah sesuai dengan bertambahnya umur maupun banyak anak yang dilahirkan. Pada golongan mamalia, ovarium terletak di dalam rongga pelvis sehingga organ ini sangat terlindungi dari kemungkinan kerusakan yang disebabkan oleh faktor luar. Ovarium ini bisa berubah-ubah letaknya karena ada kebuntingan, pertambahan umur, dan terdesak oleh organ tubuh disekitar. Ovarium terdiri dari bagian medulla (bagian dalam)

yang mengandung banyak pembuluh darah, saraf, pembuluh limfe, dan tenunan pengikat fibroblast. Sedangkan bagian korteks (bagian pinggir) terdiri dari sel-sel germinal, sel telur yang masih muda, folikel yang sedang tumbuh, folikel masak, folikel yang degenerasi dan pembuluh darah (Hardjopranto, 1995).

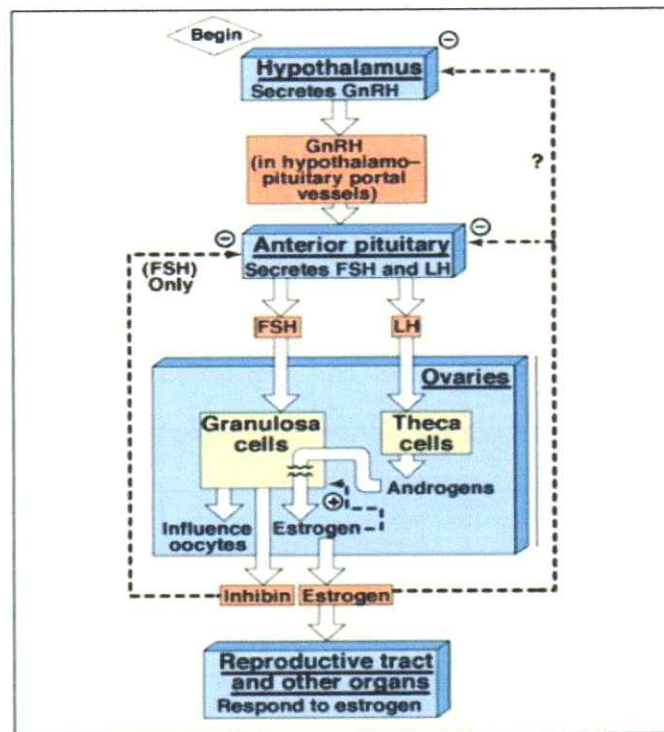


Gambar 2.4 Struktur Dinding Folikel (Sumber: Erickson, 2006).

#### 2.2.4 Luteinizing Hormone (LH)

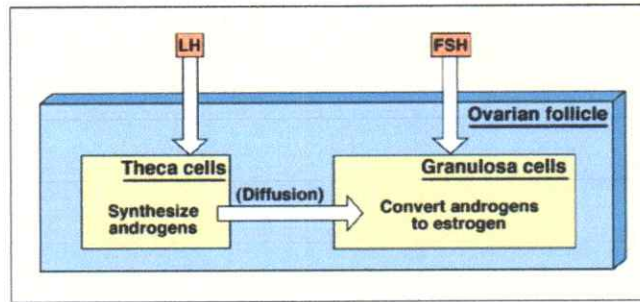
*Luteinizing hormon* (LH) disebut juga *Luteotropin atau Interstitial Cell Stimulating Hormone* (ICSH). *Luteinizing hormon* (LH) merupakan hormon glikoprotein yang terdiri atas dua subunit  $\alpha$  dan  $\beta$  dengan BM 30.000 dalton (Ismudiono dkk., 2010). Pada sel theca, LH berperan untuk meningkatkan aktivitas enzim pembelah rantai kolesterol dan meningkatkan aktivitas  $17\alpha$ -hidroksilase yang merupakan suatu enzim untuk pembentukan steroid androgen seperti dehidroandrosteron, androstenedion dan testosteron. Androstenedion yang dibentuk dalam sel theca berdifusi ke dalam cairan folikuler dan setelah itu memungkinkan sel granulosa untuk melakukan aromatisasi membentuk estron yang kemudian estradiol (Anwar, 2005).





Gambar 2.5 Regulasi Endokrin dalam Sistem Reproduksi (Sumber: Danforth, 2006).

Secara fisiologis folikel dominan akan menghasilkan estradiol yang disebut sebagai konsep “dua sel-dua gonadotropin”. Masuknya LH ke dalam sel theca interstitial akan merangsang terjadinya sintesis dan sekresi androstenedion. Jumlah sekresi androgen akan mencerminkan kandungan molekul regulator lainnya termasuk insulin, IGF-I, lipoprotein, aktivin dan inhibin. Sebagian dari androstenedion berdifusi menjadi cairan folikel yang terakumulasi dalam konsentrasi yang sangat tinggi. Sebagai respon terhadap induksi CYP450arom dalam granulosa oleh stimulasi FSH, androstenedion akan mengalami proses aromatisasi menjadi estrone yang nantinya dikonversikan menjadi estradiol (Cunningham *et al.*, 2001, Arslan *et al.*, 2003).

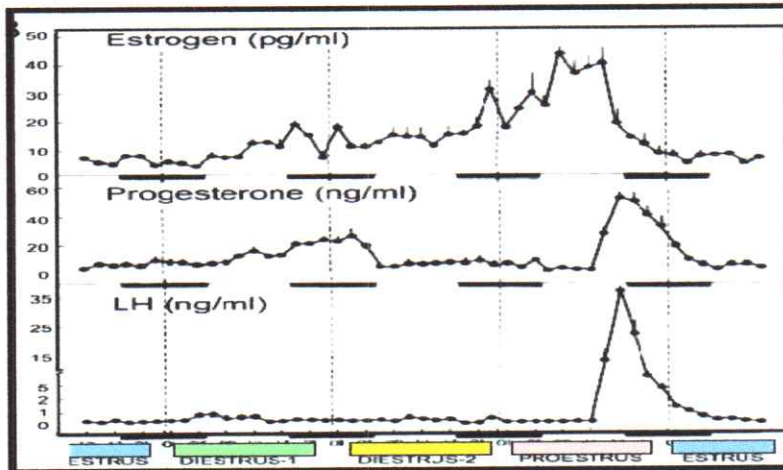


Gambar 2.6 Konsep dua sel dua gonadotropin dalam produksi estrogen yang berperan mengatur siklus birahi (Sumber: Danforth, 2006).

Selain memiliki peran penting dalam steroidogenesis untuk pertumbuhan folikel. *Luteinizing hormone* (LH) juga berperan dalam terjadinya ovulasi. Tanpa adanya LH, meskipun tersedia FSH dalam jumlah banyak, maka folikel tidak akan berkembang ke tahap ovulasi.

Sebelum ovulasi, sekresi LH oleh hipofisis anterior akan meningkat 6 hingga 10 kali lipat dan mencapai puncaknya 16 jam sebelum ovulasi. Sedangkan FSH akan meningkat 2 hingga 3 kali lipat pada saat yang bersamaan. LH juga mempunyai efek khusus terhadap sel granulosa dan sel theca, yang mengubah kedua sel tersebut menjadi lebih bersifat mensekresikan progesteron dan sedikit estrogen. Oleh karena itu, kecepatan sekresi estrogen akan turun sehari sebelum ovulasi.

Pada saat ovulasi LH akan disekresikan dalam jumlah besar oleh hipofisis anterior. Kemudian LH akan menyebabkan sekresi hormon-hormon steroid folikuler dengan cepat yang mengandung sejumlah kecil progesteron untuk pertama kali. Progesteron akan meningkatkan daya renggang dinding folikel.

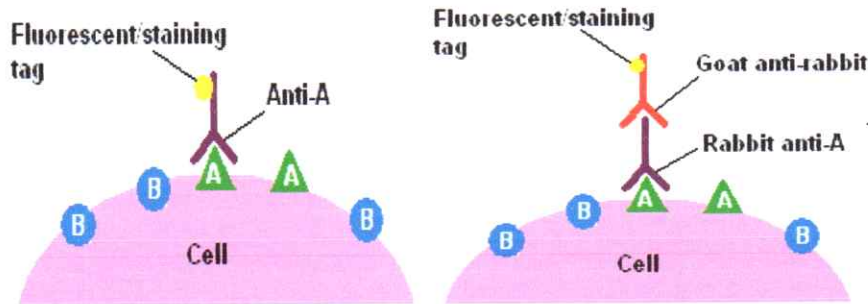


Gambar 2.7 Profil Estrogen, Progesteron dan LH pada Siklus Birahi Tikus (Sumber : Smith *et al.*, 1975).

Theca eksterna (kapsul folikel) melepaskan enzim proteolitik (kolagenase) dari lisosim yang mengakibatkan pelarutan dinding kapsul dan menyebabkan melemahnya dinding, pembengkakan folikel dan degenerasi dari stigma. Pada saat bersamaan juga terjadi pertumbuhan pembuluh darah baru yang berlangsung cepat ke dalam dinding folikel. Dengan adanya dinding pembuluh darah baru maka akan merangsang peningkatan prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) dan meningkatkan permeabilitas vaskular yang menyebabkan edema jaringan folikel dan peningkatan plasminogen.

Adanya progesteron dan prostaglandin (E dan F) akan memicu terbentuknya aktivator plasminogen yang berperan dalam perubahan plasminogen menjadi plasmin. Plasmin akan masuk ke dalam folikel dan merubah kolagenase yang tidak aktif menjadi aktif sehingga melemahkan kolagen di tunica albugenia dan lapisan theca. Plasmin akan merangsang granulosa untuk menghasilkan cairan folikel sehingga terjadi pembengkakan folikel. Pada saat yang bersamaan terjadi degenerasi stigma dengan adanya

menvisualisasikan keberadaan antigen (Rantam, 2003 dan Ramos-Vara, 2005).



Gambar 2.8 Immunohistokimia Metode *Direct* (kiri) dan *Indirect* (kanan) (Sumber: Ramos-Vara, 2005).

Teknik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode avidin-biotin complex yang diperkenalkan oleh Hsu pada tahun 1981. Teknik ini menggunakan avidin atau streptavidin yang berafinitas tinggi untuk biotin dan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik peroksidase-anti peroksidase (PAP) (Jasani *et al.*, 1993).

Metode avidin-biotin complex adalah prosedur dimana antigen akan terikat dengan antibodi dalam dua tahap. Antibodi primer akan berikatan secara langsung dengan antigen, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinisasi. Pada setiap tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul avidin (Nurhidayat, 2002). Komplek ikatan avidin-biotin inilah yang diharapkan dapat menampilkan ekspresi reseptor LH pada ovarium tikus (*Rattus norvegicus*).





**BAB 3**

**KERANGKA KONSEPTUAL  
DAN HIPOTESIS**

## BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA

### 3.1 Kerangka Konseptual

Pemberian EGCG diketahui dapat menurunkan kadar LH (Kao *et al.*, 2000). Luteinizing hormon (LH) merupakan hormon penting dalam steroidogenesis karena berperan mengkonversi kolesterol menjadi androstenedion. Androstenedion dan testosteron akan mengalami aromatisasi di sel granulosa menjadi estrogen. Hambatan pada mekanisme hormonal tersebut akan berpengaruh terhadap aktivitas ovarium pada hewan betina.

Adanya LH yang berasal dari hipofisis anterior akan berikatan dengan reseptornya di sel theca ovarium menyebabkan hormon tersebut mampu bekerja. Selain berikatan dengan reseptor, sinyal LH dapat meningkatkan transkripsi sejumlah gen yang mengkode sintesis enzim yang diperlukan untuk mengkonversi kolesterol menjadi androgen (androstenedion dan testosteron) (Richard, 1980). Mekanisme EGCG menghambat sinyal jalur PKA/ PKC, CYP450scc dan 17 $\beta$ HSD (Figueiroa *et al.*, 2009). Protein kinase A berfungsi menstimulasi sintesis StAR yang mengatur transport kolesterol ke dalam mitokondria (Strauss *et al.*, 1999).

Kolesterol masuk ke sel theca melalui reseptor lipoprotein. Penurunan sintesis StAR akan menghambat transport kolesterol dari sitoplasma ke dalam mitokondria (Strauss *et al.*, 1999). Kolesterol kemudian dikonversi menjadi pregnolone oleh sitokrom P450 *cholesterol side-chain cleavage* (CYP450scc, CYP11A1) (Hanukoglu, 1992). Pregnenolon berdifusi dari mitokondria ke

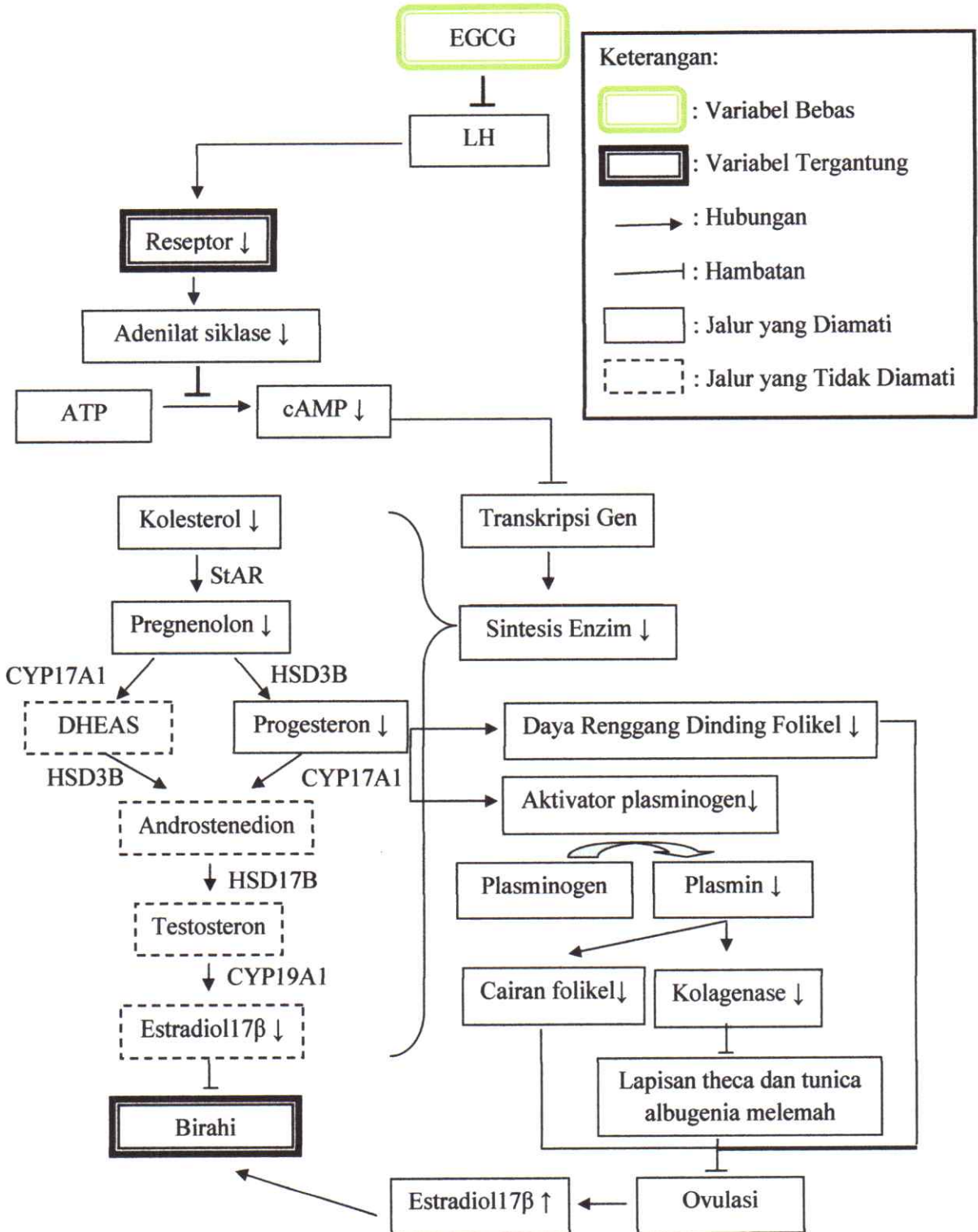
retikulum endoplasma dimana akan dikonversi menjadi progesteron oleh  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenase (HSD3B) (Hanukoglu, 1992; Penning, 1997). Kolesterol merupakan prekursor untuk sintesis hormon steroid. Hambatan transport kolesterol akan menurunkan sejumlah sintesis hormon steroid termasuk progesteron. Penurunan progesteron akan menurunkan daya renggang dinding folikel dan menghambat terbentuknya aktivator plasminogen yang berperan merubah plasminogen menjadi plasmin. Penurunan plasmin akan menginaktivkan kolagenase dan menghambat produksi cairan folikel oleh sel granulosa. Penurunan daya renggang dinding folikel, inaktivasi kolagenase dan penurunan produksi cairan folikel akan menyebabkan kegagalan ovulasi sehingga hewan akan terus mengalami birahi.

Penurunan kadar progesteron dan hambatan sintesis HSD17 $\beta$  juga akan memicu penurunan sintesis testoteron dan estradiol17 $\beta$ . Penurunan progesteron akan menurunkan kadar androstenedion. Hambatan HSD17 $\beta$  menyebabkan penurunan konversi androstenedion menjadi testoteron di sel theca dan menurunkan difusi androstenedion dan testoteron ke sel granulosa. Androstenedion akan dikonversi menjadi estron sedangkan testoteron akan dikonversi menjadi estrogen oleh aromatase (CYP450arom). Reaksi tersebut disebut sebagai aromatisasi (Hanukoglu, 1992). Adanya penurunan testoteron dan androstenedion akan menghambat sintesis estradiol17 $\beta$ .

Estradiol17 $\beta$  merupakan hormon yang mempengaruhi tingkah laku birahi pada hewan betina. Birahi dapat diketahui dengan melakukan swab vagina. Swab vagina akan tampak gambaran sel yang mencerminkan aktivitas dari ovarium.

Aktivitas ovarium terbagi atas fase luteal yang pada gambaran swab vagina akan menunjukkan fase metestrus dan diestrus sedangkan fase folikuler pada swab vagina menunjukkan fase proestrus dan diestrus. Adanya hambatan baik pada proses maupun sintesis enzim yang berperan pada mekanisme tersebut akan berpengaruh terhadap produksi hormon yang mengatur tanda birahi pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina.





Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, dapat diperoleh hipotesa:

1. Pemberian berbagai dosis EGCG dapat memperpanjang fase folikuler pada tikus (*Rattus norvegicus*) betina.
2. Pemberian berbagai dosis EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina.



**BAB 4**

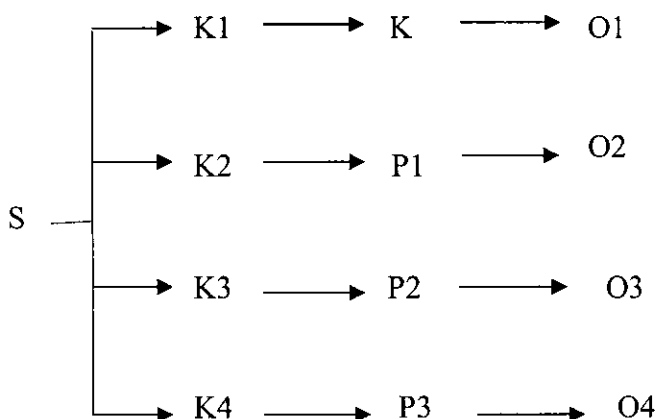
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## BAB 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian “the randomized post test only control group design” (Zainuddin, 2000). Rancangan penelitian ini untuk mengetahui ada tidaknya efek dari perlakuan.

Sampel penelitian dibagi empat kelompok secara acak, kelompok pertama merupakan kontrol (K), kelompok ke dua merupakan kelompok perlakuan 1 (P1) yang diberi EGCG dosis 4,05 mg/ 100g tikus secara peroral dan kelompok ke tiga merupakan kelompok perlakuan 2 (P2) yang diberikan EGCG 8,1 mg/ 100 gram tikus secara peroral dan kelompok perlakuan 3 (P3) diberi EGCG dosis 12,15mg/ 100g tikus secara peroral. Lalu dilakukan pengukuran variabel pada akhir penelitian.



Keterangan :

- S : Sampel
- K1 : Kelompok kontrol
- K2 : Kelompok perlakuan 1
- K3 : Kelompok perlakuan 2
- K4 : Kelompok perlakuan 3
- K : Perlakuan dengan aquadest
- P1 : Perlakuan dengan EGCG 4,05 mg/ 100 gram tikus
- P2 : Perlakuan dengan EGCG 8,1 mg/ 100 gram tikus
- P3 : Perlakuan dengan EGCG 12,15 mg/ 100 g tikus
- O1-O4 : Pengamatan

## 4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

### 4.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus betina sebagai hewan coba laboratorium. Adapun kriteria subyek penelitian yang digunakan adalah tikus betina yang sehat, umur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 100-150 gram dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain.

### 4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah 24 ekor tikus betina, umur 2-3 bulan, dengan berat badan 100-150 gram. Sampel penelitian dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol K mendapatkan aquadest secara peroral. Kelompok P1 mendapat EGCG 4,05 mg/ 100 gram tikus secara peroral. Kelompok P2 mendapat EGCG dosis 8,1 mg/ 100 gram tikus secara peroral. Kelompok P3 mendapat EGCG sebanyak 12,15mg/ 100 gram tikus secara peroral. Perlakuan diberikan

selama tujuh hari. Pada hari ke-8 dilakukan pembedahan untuk pengambilan sampel ovarium.

#### 4.2.3 Besar Sampel

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

Dengan  $n$  : ulangan

$t$  : jumlah perlakuan = 4

dengan  $t = 4$ , maka didapatkan

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

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

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

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan ulangan minimal yang dibutuhkan untuk empat perlakuan adalah enam. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 24 ekor.

### 4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis pemberian EGCG yaitu 4,05 mg, 8,1mg dan 12,15mg/ 100 gram tikus.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi reseptor LH dan aktivitas ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina.

### 4.3.3 Variabel Kendali

Jenis kelamin dan umur mencit, kesehatan fisik, pemeliharaan serta perawatan.

### 4.3.4 Definisi Operasional Variabel

#### 1. *Epigallocatechin gallate* (EGCG)

Bahan EGCG (E110322) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil ekstraksi dari teh hijau yang diproduksi oleh Chengdu Phytochemical Ltd. Bahan EGCG dilarutkan dalam aquadest.

#### 2. Ekspresi reseptor LH

Ekspresi reseptor LH merupakan ikatan antara antigen terhadap antibodi primer (antibodi monoklonal anti LH) dan antibodi sekunder (biotin) yang apabila diwarnai dengan kromogen (*Diaminobenzidine*) akan menampilkan warna coklat. Bagian lain yang tidak terdapat ekspresi reseptor LH akan terwarnai dengan *counterstain metilgreen* sehingga berwarna hijau.

Pengaruh pemberian EGCG terhadap ekspresi reseptor LH dapat diketahui dengan teknik imunohistokimia. Teknik imunohistokimia, dilakukan penambahan antibodi monoklonal anti-LH yang menyebabkan protein LH terikat secara spesifik. Antibodi primer selanjutnya akan berikatan dengan antibodi sekunder yang mengalami biotinilasi. Pada setiap tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang dapat berikatan dengan molekul

avidin (Nurhidayat, 2002). Komplek ikatan avidin-biotin ini selanjutnya diwarnai dengan kromogen DAB sehingga mampu mengekspresikan reseptor LH dengan munculnya warna coklat di sel theca ovarium. *Counterstain metil green* akan memberi warna hijau pada daerah yang tidak terdapat komplek antigen-antibodi.

Ekspresi reseptor LH antara kontrol dan perlakuan selanjutnya dianalisis secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007). Data diuji dengan metode nonparametrik Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.

### 3. Aktivitas ovarium

Aktivitas ovarium terbagi atas dua fase yaitu fase luteal dan fase folikuler. Kedua fase tersebut dapat diketahui dengan mengamati gambaran hasil swab vagina. Gambaran sel hasil swab vagina akan menampilkan empat periode yaitu periode proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Fase luteal diwakili oleh periode metestrus dan diestrus. Periode folikuler diwakili oleh periode proestrus dan estrus. Periode proestrus akan tampak adanya epitel utuh (inti parabasal). Periode estrus pada sediaan swab vagina akan tampak sel yang mengalami kornifikasi dan inti karioreksis. Periode metestrus akan tampak adanya sel epitel yang mengalami kornifikasi, inti mulai lisis dan munculnya sel-sel leukosit disekitar sel epitel. Sedangkan periode diestrus adalah periode yang tampak



sel leukosit dan sel basal, dengan sel epitel yang berproliferasi dalam jumlah yang sedikit atau tidak ada sama sekali (Mandl, 1951).

#### 4.4 Bahan Penelitian

Bahan untuk pemeliharaan tikus berupa: air minum (*ad libitum*), sekam dan makanan hewan coba berupa pellet. Bahan untuk swab vagina: *cotton buds*, aquadest, alkohol fiksatif 70%, Phosphat Buffer Saline (PBS) dan larutan pewarna Giemsa. Bahan untuk pemberian EGCG: EGCG (E110322) Chengdu Phytochemical Ltd. dan aquadest. Bahan untuk pengambilan sampel ovarium: cloroform dan alkohol 70%. Bahan kimia untuk Immunohistokimia: *mouse* antibodi monoklonal anti-reseptor LH, PBS 10%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *biotinylated link*, *streptavidin*®, DAB (*Diaminobenzidine*), eter, aquades, *metil green* dan *blocking buffer ultra V block*.

#### 4.5 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba meliputi: kandang hewan coba, *air flow*, tempat makan dan tempat minum. Alat untuk swab vagina meliputi: pipet, *object glass*, *cover glass* dan mikroskop cahaya. Alat untuk pemberian EGCG: timbangan digital dengan skala gram, sendok kecil, kertas perkamen, sonde yang dihubungkan dengan spuit 6 cc, gelas ukur, bak plastik dan erlenmeyer. Peralatan yang digunakan untuk pengambilan sampel ovarium: papan seksi, *dissecting set* dan pot plastik. Peralatan untuk pemeriksaan ekspresi reseptor LH dengan immunohistokimia: mikroskop *inverted* (Nikon Eclipse E3100), pipet *pasteur*, gelas obyek berlabel *poly L-lysine*, dan gelas penutup.

#### 4.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan hewan coba, pemberian EGCG dan swab vagina dilakukan di kandang hewan coba Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pembuatan preparat histologis dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Pemeriksaan ekspresi reseptor LH dengan teknik immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2012.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Prosedur Penentuan Aktivitas Ovarium dengan Swab Vagina

*Cotton bud* dibilas dengan aquadest dan dimasukkan ke dalam vagina tikus betina dengan sudut  $\pm 45^\circ$  dan diusap sebanyak 2-3 kali putaran. Hasil usapan dari *cotton bud* dibuat preparat dengan cara mengoleskan pada object glass. Preparat hapusan vagina dimasukkan ke dalam larutan alkohol fiksatif 70% selama 10 menit, kemudian diangkat dan dikeringkan. Hapusan lalu dimasukkan ke dalam zat warna Giemsa selama 5 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya mengamati morfologi sel epitel pada preparat yang telah dibuat di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah (100x) kemudian perbesaran kuat (400x) (Mandl, 1951; Brancoft and Steven, 1999). Pengamatan dilakukan untuk menentukan fase birahi sebelum

pemberian EGCG sedangkan pengamatan setelah pemberian EGCG dilakukan setiap 24 jam selama tujuh hari.

#### **4.7.2 Prosedur Pemberian Epigallocatechin Gallate (EGCG)**

Epigallocatechin Gallate (EGCG) dosis 4,05mg, 8,1mg dan 12,15 mg/ 100 gram tikus dilarutkan dalam aquadest yang selanjutnya diberikan secara peroral dengan sonde. Tikus diberi EGCG sesuai dosis dengan volume 1 ml. Sonde di arahkan ke lambung kemudian larutan dimasukkan secara perlahan. Pemberian EGCG dilakukan selama tujuh hari.

#### **4.7.3 Prosedur Pengambilan Sampel**

Tikus dikorbankan dengan cara dianasthesi menggunakan kloroform. Setelah teranasthesi tikus selanjutnya diterlentangkan dan didesinfeksi dengan alkohol 70%. Tikus dibedah dan dilakukan pengambilan sampel ovarium. Sampel ovarium selanjutnya dibawa ke Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

#### **4.7.4 Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium**

Sampel ovarium yang diperoleh dimasukan dalam larutan fiksatif. Sampel kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan pembuatan preparat histologi (Lampiran 1).

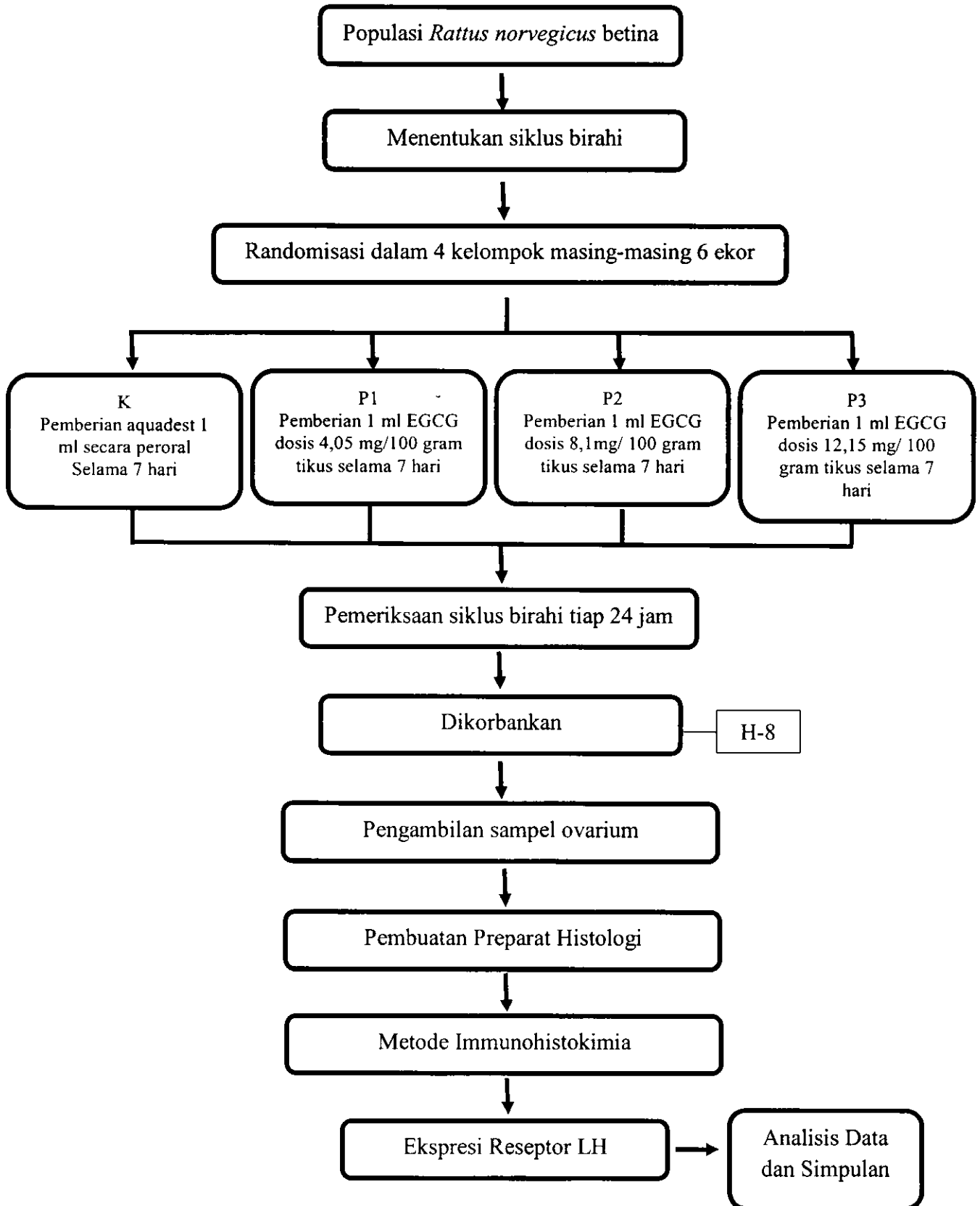
#### 4.7.4 Prosedur Pemeriksaan Ekspresi reseptor LH

Preparat histologi selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang untuk dilakukan pemeriksaan ekspresi reseptor LH dengan teknik immunohistokimia pada ovarium tikus. Teknik Immunohistokimia, sebagaimana yang terlampir pada Lampiran 2, menggunakan teknik *avidin-biotin complex* yang dapat mengidentifikasi ekspresi reseptor LH melalui perubahan warna yang ditampilkan. Adanya warna coklat menunjukkan teridentifikasinya ekspresi reseptor LH. Ekspresi reseptor LH selanjutnya dibandingkan antara kontrol dan perlakuan.

#### 4.8 Analisis Data

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah panjang fase luteal, fase folikuler dan ekspresi reseptor LH pada ovarium tikus (*Rattus norvegicus*) betina. Panjang fase folikuler dalam bentuk prosentase dianalisis secara deskriptif. Ekspresi reseptor LH dianalisis secara statistik menggunakan uji nonparametrik Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Man-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan.

#### 4.9 Kerangka Operasional Penelitian





**BAB 5**

**HASIL PENELITIAN**

## BAB 5. HASIL PENELITIAN

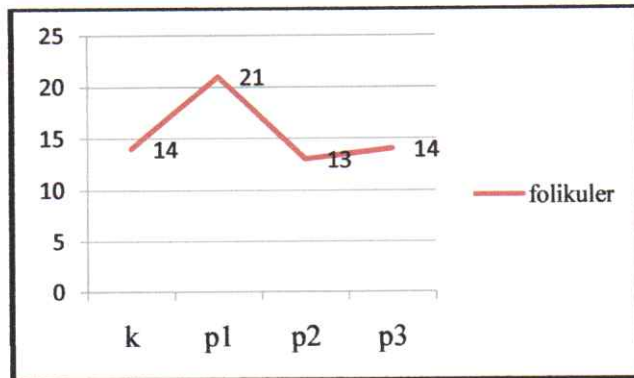
Hasil penelitian berbagai perlakuan yaitu (K) kelompok kontrol yang hanya diberi aquadest, (P1) kelompok perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 4,05mg/ 100 gram tikus selama 7 hari, (P2) kelompok perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 8,1mg/100 gram tikus selama 7 hari dan (P3) kelompok perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 12,15mg/ 100 gram tikus selama 7 hari terhadap aktivitas ovarium dan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus dapat diamati pada penjelasan di bawah ini.

### 5.1 Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Aktivitas Ovarium

Pengaruh pemberian EGCG terhadap aktivitas ovarium dapat diketahui dengan melakukan swab vagina tiap 24 jam. Data hasil pencatatan digunakan untuk menentukan panjang fase folikuler dalam satu siklus birahi (enam hari). Panjang fase dalam bentuk prosentase dianalisis secara deskriptif. Data pengaruh pemberian EGCG terhadap panjang fase folikuler dapat diamati pada tabel 5.1 berikut ini.

Tabel 5.1 Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Panjang Fase Folikuler.

(n)	Panjang Fase Folikuler (%)			
	K	P1	P2	P3
1	33,3	50	16,7	50
2	50	83,3	16,7	50
3	33,3	50	33,3	16,7
4	33,3	50	50	66,7
5	50	66,7	66,7	50
6	33,3	50	33,3	50
Rerata	38,9			

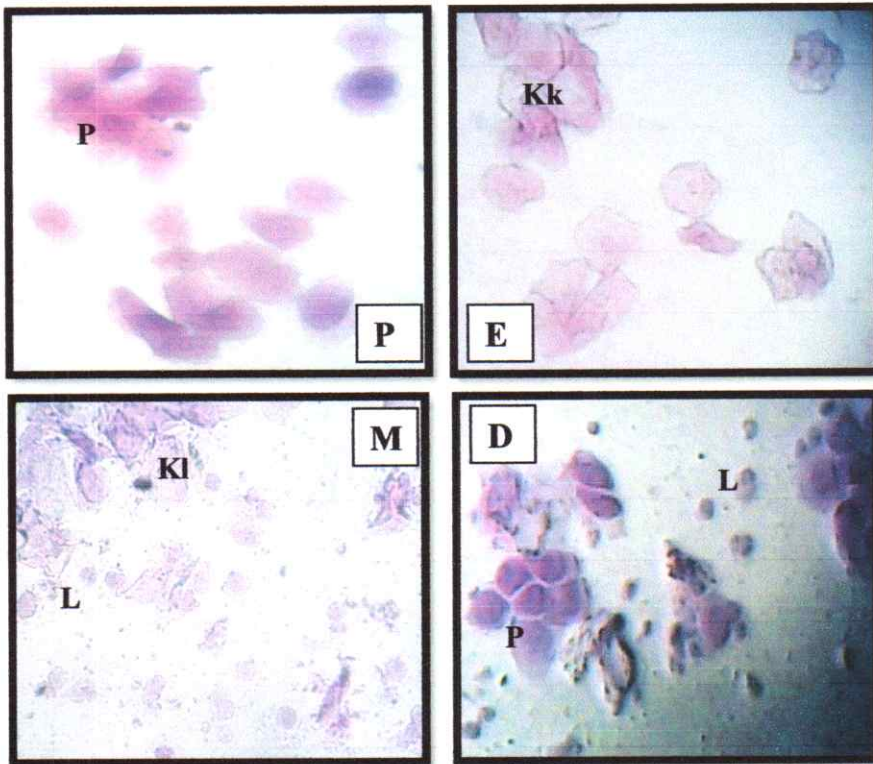


Gambar 5.1 Grafik Pemberian EGCG terhadap Panjang Fase Folikuler.

Berdasarkan tabel 5.1 dan gambar 5.1 dapat diketahui bahwa pemberian EGCG dapat memperpanjang fase folikuler antara 11,1 hingga 44,4% pada dosis 4,05mg/ 100 g tikus, 11,1 hingga 27,8% pada dosis 8,1mg/ 100 g dan 11,1 hingga 27,8% pada dosis 12,15 mg/ 100 g tikus jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan hasil tersebut maka dapat diketahui bahwa pemberian EGCG berpengaruh terhadap aktivitas ovarium dengan memperpanjang fase folikuler. Fase folikuler pada swab vagina akan menunjukkan periode proestrus dan estrus. Gambaran masing-masing periode dapat diamati pada gambar 5.2 berikut ini.





Gambar 5.2 Swab Vagina Fase Proestrus (P), Estrus (E), Metestrus (M) dan Diestrus (D). Pembesaran 400x.

Keterangan:

P : Sel epitel utuh

Kk: Sel yang mengalami kornifikasi dengan inti karioreksis (pecah)

Kl : Sel mengalami kornifikasi dengan inti lisis (hilang)

L : Sel leukosit

## 5.2 Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Ekspresi Reseptor LH dengan Metode Immunohistokimia

Ekspresi reseptor LH pada setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi (Novak *et al.*, 2007). Indeks skala Remmele (IRS) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif (A) dengan skor intensitas warna yang dihasilkan pada sel (B).

Pengaruh pemberian EGCG terhadap ekspresi reseptor LH di ovarium dengan pewarnaan imunohistokimia dihitung secara semikuantitatif, data selengkapnya dapat diamati pada tabel 5.2 dan 5.3.

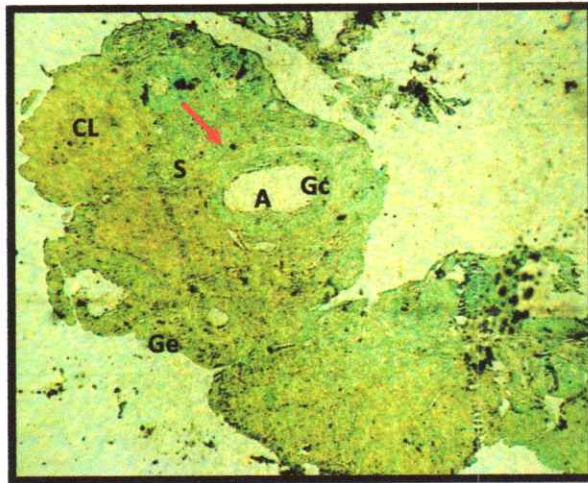
Tabel 5.2 Skala Semikuantitatif IRS Merupakan Hasil Perkalian Antara Skor Prosentase Sel Positif (A) dengan Skor Intensitas Reaksi Warna (B).

<b>A</b>	<b>B</b>
Skor 0 : Tidak ada sel positif	Skor 0 : Tidak ada reaksi warna
Skor 1 : sel positif kurang dari 10%	Skor 1 : Intensitas warna lemah
Skor 2 : sel positif antara 11-50%	Skor 2 : Intensitas warna sedang
Skor 3 : Sel positif antara 51-80%	Skor 3 : Intensitas warna kuat
Skor 4 : Sel positif lebih dari 80%	

Tabel 5.3 Ekspresi Sel Imunoreaktif LH pada Ovarium Tikus

PERLAKUAN		SKOR PERSENTASE POSITIF (A)	SKOR INTENSITAS WARNA (B)	INDEKS IRS (A X B)
<b>K</b> Kontrol dengan pemberian aquadest 1 ml selama 7 hari	K1	2	3	6
	K2	3	2	6
	K3	3	2	6
	K4	3	1	3
	K5	3	2	6
	K6	2	2	4
<b>P1</b> Pemberian EGCG dosis 4,05mg/ 100 gram tikus selama 7 hari	P1-1	2	1	2
	P1-2	1	2	2
	P1-3	3	1	3
	P1-4	2	2	4
	P1-5	2	2	4
	P1-6	2	1	2
<b>P2</b> Pemberian EGCG dosis 8,1mg/ 100 gram tikus selama 7 hari	P2-1	2	1	2
	P2-2	1	1	1
	P2-3	2	1	2
	P2-4	1	2	2
	P2-5	2	1	2
	P2-6	2	1	2
<b>P3</b> Pemberian EGCG dosis 12,15mg/ 100 gram tikus selama 7 hari	P3-1	0	0	0
	P3-2	2	1	2
	P3-3	1	1	1
	P3-4	1	1	1
	P3-5	1	3	3
	P3-6	1	2	2

Semua perlakuan diuji dengan Uji Kruskal Wallis dan didapatkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney antar dua perlakuan masing-masing.



Keterangan:

A : Antrum

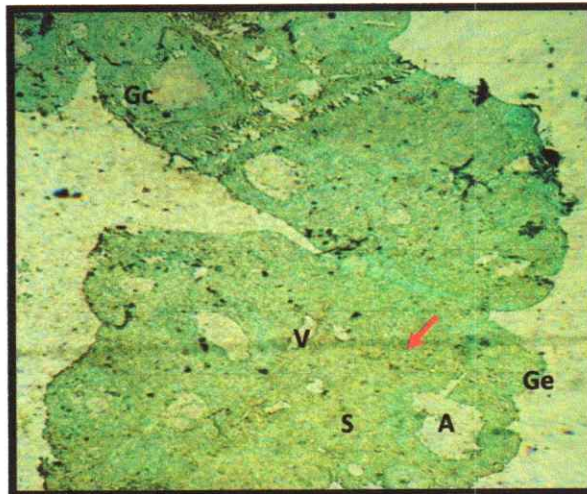
Gc : Sel granulosa

Ge : Germinal epiteliium

S : Stroma

CL :Corpus luteum

Gambar 5.3 Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*) pada kelompok kontrol. Pembesaran: 100x



Keterangan:

A : Antrum

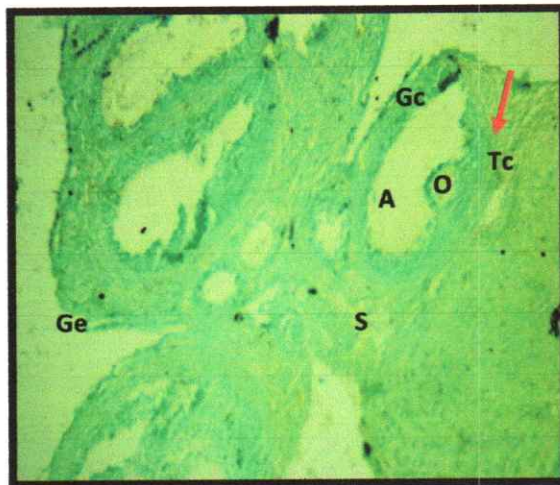
Gc : Sel granulosa

Ge : Germinal epiteliium

S : Stroma

V : Pembuluh darah

Gambar 5.4 Pengaruh Pemberian EGCG dosis 4,05mg terhadap Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*). Pembesaran: 100x



Keterangan:

A : Antrum

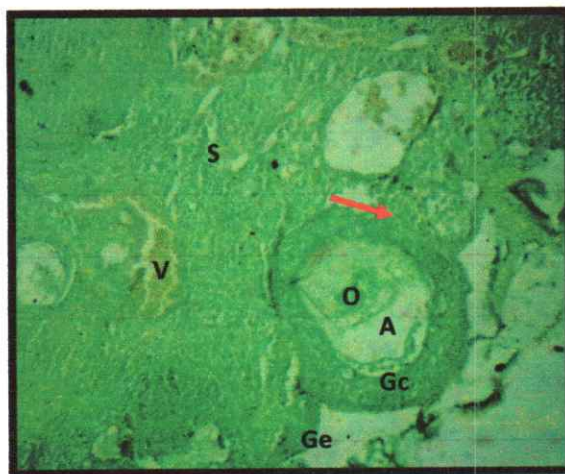
Gc : Sel granulosa

Ge : Germinal epitelium

O : Oosit

S :Stroma

Gambar 5.5 Pengaruh Pemberian EGCG dosis 8,1 mg terhadap Ekspresi Reseptor LH (panah) di Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*). Pembesaran 400x



Keterangan:

A : Antrum

Gc : Sel granulosa

Ge : Germinal epitelium

O : Oosit

S : Stroma

V : Pembuluh darah

Gambar 5.6 Pengaruh Pemberian EGCG dosis 12,15 mg terhadap Ekspresi Reseptor LH di Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*). Pembesaran 400x.



Tabel. 5.4 Uji Mann Whitney Hasil Ekspresi reseptor LH

IMUNOHISTOKIMIA EKSPRESI RESEPTOR LH		
KELOMPOK	PERLAKUAN	SIG
K	P1	,016*
	P2	,002*
	P3	,004*
P1	P2	,045*
	P3	,055
P2	P3	,471

\*Signifikan  $p < 0,05$ 

Keterangan:

- K : Kontrol dengan pemberian aquadest 1 ml selama 7 hari  
P1 : Perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 4,05mg/ 100 gram tikus selama 7 hari  
P2 : Perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 8,1mg/ 100 gram tikus selama 7 hari.  
P3 : Perlakuan dengan pemberian EGCG dosis 12,15mg/ 100 gram tikus selama 7 hari.

Hasil analisis perhitungan dilakukan dengan Uji Kruskal Wallis terhadap keseluruhan perlakuan didapatkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ). Kemudian dari hasil analisis dilakukan perbandingan antar perlakuan dengan Uji *Mann-Whitney*. Berdasarkan tabel 5.3 dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan ekspresi reseptor LH yang signifikan antara kontrol dengan perlakuan P1, P2 dan P3. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi reseptor LH antara tikus yang hanya diberi aquadest dengan yang diberi EGCG. Perbandingan antara P1 (dosis 4,05 mg/ 100 gram tikus) dengan P2(dosis 8,1mg/100 gram tikus) menunjukkan hasil yang signifikan sedangkan bila dibandingkan dengan P3 (dosis 12,15mg/ 100 gram tikus) tidak menunjukkan hasil yang signifikan. Hal tersebut

menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan ekspresi reseptor LH antara dosis 4,05 dan 12,15 mg/ 100 g.



**BAB 6**

**PEMBAHASAN**



## BAB 6. PEMBAHASAN

### 6.1 Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Aktivitas Ovarium

Pemberian EGCG diketahui mampu menurunkan kadar LH dalam serum (Kao *et al.*, 2000). Penurunan LH akan menurunkan kompleks ikatan hormon reseptor. Mekanisme LH dalam steroidogenesis adalah meningkatkan adenilat siklase sehingga terbentuk cAMP yang dapat menyebabkan transkripsi sejumlah enzim yang diperlukan dalam steroidogenesis (Craig *et al.*, 2001). Adanya penurunan sinyal LH akan menghambat sintesis adenilat siklase sehingga cAMP akan menurun. Peran cAMP adalah mengaktifkan protein kinase A yang meningkatkan sintesis StAR. Penurunan cAMP akan berpengaruh terhadap penurunan sintesis protein StAR sehingga transport kolesterol ke dalam mitokondria juga akan berkurang. Berkurangnya transport kolesterol menyebabkan penurunan produksi pregnenolon juga progesteron (Estrabrook and Rainey, 1996).

Pemberian EGCG menjelang ovulasi (fase folikuler) akan menurunkan kadar LH sehingga menyebabkan kegagalan ovulasi. Menjelang ovulasi sekresi LH seharusnya meningkat hingga 10 kali lipat. LH memiliki efek khusus terhadap sel granulosa dan sel theca, yang mengubah kedua sel tersebut lebih bersifat mensekresi progesteron dan sedikit estrogen. Namun akibat adanya penurunan LH maka produksi progesteron juga akan terhambat. Penurunan progesteron menyebabkan penurunan daya renggang dinding folikel. Progesteron bersama dengan PGE dan PGF akan memicu terbentuknya aktivator plasminogen yang merubah plasminogen menjadi

plasmin. Plasmin berfungsi mengaktifkan kolegenase yang melemahkan kolagen di tunica albugenia dan lapisan theca juga merangsang sel granulosa untuk aktif menghasilkan cairan folikel. Namun penurunan progesteron menyebabkan terhambatnya pembentukan plasmin yang menyebabkan produksi dari kolegenase juga berkurang sehingga lapisan theca dan tunica albugenia masih kuat. Terhambatnya plasmin juga menyebabkan penurunan sekresi cairan folikel. Penurunan sekresi cairan folikel, penurunan daya renggang folikel dan penurunan jumlah kolagenase yang aktif menyebabkan terhambat atau gagalnya ovulasi (DeCherney and Pernoll, 1994).

Kegagalan ovulasi menyebabkan akumulasi estradiol $17\beta$  dalam folikel dalam jumlah yang cukup banyak sehingga tikus akan mengalami birahi yang panjang atau terus menerus (nimfomani). Nimfomani disebabkan berkurangnya kadar LH tetapi FSH diproduksi dalam jumlah yang cukup. Berdasarkan data siklus birahi (Lampiran 4) pada akhirnya tikus mengalami ovulasi setelah mengalami birahi yang cukup panjang (*delay ovulation*). Hal tersebut disebabkan karena banyaknya akumulasi estradiol $17\beta$  dalam folikel yang dapat meningkatkan ekspresi reseptor LH sehingga proses ovulasi dapat terjadi dan memasuki tahap luteal (Hariadi dkk., 2011).

## **6.2 Pengaruh Pemberian EGCG terhadap Ekspresi Reseptor LH**

*Epigallocatechin gallate* (EGCG) diketahui mampu memberikan pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi reseptor LH di ovarium. Pemberian EGCG diketahui mampu menurunkan kadar LH hingga 40-50% pada tikus baik jantan maupun betina (Kao *et al.*, 2000). Reseptor LH

merupakan pasangan G-protein yang memodulasi fungsi sel dengan mengaktivasi jalur sinyal *second messenger* dan berikatan dengan ligan hormon peptida (Magoffin and Erickson, 1982; Wang *et al.*, 1982).

*Luteinizing hormone* (LH) yang disekresi dari hipofisis anterior akan berikatan dengan reseptornya di sel theca ovarium. *Luteinizing hormone* (LH) merupakan hormon protein yang melakukan regulasi fungsi sel melalui pengikatan pada reseptor yang spesifik dari membran sel yang mengontrol enzim adenilat siklase, yang bertanggung jawab terhadap katalisasi konversi ATP menjadi cAMP dan pirofosfat. Messenger pertama adalah hormon itu sendiri yang akan berikatan dan berinteraksi dengan reseptor di permukaan sel target organ. Hal tersebut akan berpengaruh terhadap penurunan aktivitas enzim adenilat siklase sehingga menurunkan konsentrasi cAMP yang merupakan messenger kedua. *Cyclic adenosin monophosphate* (cAMP) beraksi terhadap enzim ptoteinkinase yang terdiri atas dua subunit yang berbeda yaitu subunit regulator dan katalitik. Bila cAMP berkombinasi dengan subunit regulator maka akan menyebabkan disosiasi dari dua subunit tersebut. Kombinasi dengan subunit regulator juga menyebabkan terhambatnya subunit katalitik. Bila bebas, maka subunit katalitik akan aktif dan katalisasi fosforilasi satu atau lebih protein spesifik dengan sel. Fosforilasi yang terjadi di dalam inti akan mempengaruhi informasi genetik DNA untuk memproduksi enzim spesifik yang mempengaruhi transkripsi RNA sehingga mempengaruhi sintesis mRNA baru yang menyebabkan

disintesisnya protein dalam sitoplasma untuk pembentukan enzim dalam biosintesis steroid (Ismudiono dkk., 2010).

Sinyal LH menyebabkan transkripsi sejumlah gen yang mengkode sintesis enzim yang berfungsi mengkonversi kolesterol menjadi androgen (androstenedion dan testosteron) (Richardson, 1980). Sebagian dari androstenedion akan berdifusi menjadi cairan folikuler di sel granulosa. Sebagai respon terhadap induksi CYP450arom di granulosa oleh stimulasi FSH, maka androstenedion akan mengalami aromatisasi menjadi estrone yang nantinya akan dikonversi menjadi estrogen. Adanya penurunan sekresi LH yang disebabkan pemberian EGCG akan menurunkan kompleks ikatan hormon-reseptor sehingga akan berpengaruh terhadap sintesis enzim yang diperlukan untuk produksi sejumlah hormon steroid, perkembangan folikel serta menghambat ovulasi (Arslan *et al.*, 2003).



**BAB 7**

**KESIMPULAN**

## BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Pemberian EGCG dapat mempengaruhi aktivitas ovarium dengan memperpanjang fase folikuler hingga 44,4%. Pemberian EGCG dapat menurunkan ekspresi reseptor LH di ovarium tikus betina (*Rattus norvegicus*). Dosis efektif EGCG dalam menurunkan ekspresi reseptor LH adalah 40,5 mg/kg BB pada tikus.

### 7.2 Saran

Perlu diinformasikan bahwa di dalam teh hijau terkandung zat aktif *epigallocatechin gallate* (EGCG) yang dapat berpengaruh terhadap mekanisme hormonal pada organ reproduksi sehingga masyarakat diharapkan lebih berhati-hati untuk mengonsumsi teh hijau.





DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Adhami, V.M., N. Ahmad and H. Mukhtar. 2003. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *Journal of Nutrition*. 133: 2417-2424.
- Adeputri, T.I. 2002. Pengaruh pemberian polifenol teh hijau terhadap sekresi nitrit oksida sel fagosit [Skripsi]. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Anwar, R. 2005. Morfologi dan Fungsi Ovarium. Fakultas Kedokteran Universitas Padjajaran. Bandung.
- Arakawa, H., M. Maeda, S. Okubo and T. Shimamura. 2004. Role of hydrogen peroxide in bacterial action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27: 277-281.
- Arslan, A., A. Zeleniuch-Jacquotte and A. Lukanova. 2003. Reliability of Follicle Stimulating Hormone Measurement in Serum. *Journal Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 49.
- Basini, G., F. Bianco and F. Grasselli. 2004. Epigallocatechin-3-gallate from green tea negatively effects swine granulosa cell function. *Journal Animal Biology*. 10.
- Brancroft, J.D. dan A. Stevens. 1999. *Theory and Practise of Histological Techniques*. 4th.ed. Churchill Livingstone. Edinburg.
- Craig, Z.R., W. Wang and J.A. Flaws. 2001. Endocrine Disrupting chemical in Ovarian Function: Effect on Steroidogenesis, Metabolism and Nuclear Receptor Signaling. *Journal of Reproduction*. 142: 633-646.
- Cunningham, F.G., N.F. Gant, K.J. Leveno. 2001. *William Obstetric*. 21th.ed. McGraw Hill. New York. 538-542.
- DeCherney, A.H. and M.L. Pernoll. 1994. *Curent Obstetric and Gynecology Diagnosis and Treatment*. 8th.ed. Large Medical Book. 126-127.
- Figueiroa, M.S., S.B. Juliany, C. Vieira, D.S. Leite, R.C.O.A Filho, F. Ferreira, P.S. Gouveia, D.P. Udrisar and M.I. Wanderley. 2009. Green tea polyphenols inhibits testosterone production in rat leydig cells. *Asian J. of Andrology*. 11: 362-370.



- Fulder, S. 2004. Khasiat teh hijau. Prestasi Pustaka Jakarta. Jakarta. 3-6, 22-23.
- Hariadi, H.M., S. Hardjopranjoto, Wurlina, H.A. Hermadi, B. Utomo, Rimayanti, I.N. Triana dan H. Ratnani. 2011. Buku Ajar Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. 52-57.
- Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction in Farm Animal. 7 th. Ed. Lappincott Williams and Wilkin. Philadelphia. 48-52.
- Hanukoglu, I. 1992 Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 43:779–804.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. 19-30.
- Hill, J.W., J.K. Elmquist and C.F. Elias. 2008. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 294:827– 832.
- Hsu, S.M., L. Raine and H. Fanger. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *American Journal Clinical Pathology*. 75: 816 – 821.
- Ismudiono, P. Srianto, H. Anwar, S.P. Madyawati, A. Samik dan E. Safitri. 2010. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya.
- Jasani, Bharat and Kurt.W Schmidt. 1993. Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journal/> [13 Juni 2012].
- Jusuf, A.A. 2009. Histoteknik Dasar. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. <http://staff.ui.ac.id/internal/132015140/HISTOTEKNIKDASAR.2009.doc>.
- Kao, Y., R.A. Hiipakka and S. Liao. 2000. Modulation of endocrine system and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Journal Endocrinology*. 141 (3): 980-987.
- Liao, S., Y. Umekita, J. Guo, J.M. Kokontis and R.A. Hiipakka. 1995. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by green tea epigallocatechin gallate. *Cancer lett*. 96: 239-243.
- Magoffin, D. and G. Erickson.1982. Primary culture of differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. *Journal of Biological Chemistry*. 25:4507–4513.

- Malole, M.M.B, Pramono, C.S.U.,1989. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Mandl, A.M. 1951. The Phase of The Oestrous Cycle in The Adult White Rat. J. Anatomy.
- Morel, I., G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent and N. Padeloup. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. J. Biochem. Pharmacol. 45: 13-19.
- Nurhidayat. 2002. Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis : Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia. Institut Pertanian Bogor. 1-14.
- Penning, T. 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocrine Reviews. 18:281-305.
- Ramos-Vara, JA. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. Journal Veterinary Pathology. 42 (4): 405-426.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Immunologi. Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. 23-136.
- Richards, J. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. Physiological Reviews. 60:51-89.
- Roy, M., S. Chakrabarty, D. Sinha, R.K. Bhattacharya and M. Shiddiqi. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. Mutation Research. 523-524, 533-541.
- Satoh, K., Y. Sakamoto, A. Ogata, F Nagai, H. Mikuriya, M. Numazawa, K. Yamada and N. Aoki. 2002. Inhibition of Aromatase Activity by Green Tea Extract Catechin and Their Endocrinology Effect of Oral Administration in Rats. J. Food Chem. Toxicol. 40(7):925-933.
- Shrestha, J., T. Shanbhag, S. Shenoy, A. Amuthan, K. Prabhu, S. Sharma, S. Banerjee and S. Kafle. 2010. Antioviulatory and abortifacient effects of *Areca catechu* (betel nut) in female rats. Indian Journal of Pharmacology. 42 (5): 306-311.

- Smith, J.B. and S. Mangoewidjojo. 1987. The Care, Breeding and Management of Experimental Animals for Research in The Tropics. International Development Program of Australian Universities and Colleges Limited (IDP), Canberra.
- Strauss, J., C. Kallen, L. Christenson, H. Watari, L. Devoto, F. Arakane and M. Kiriakidou. 1999. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Progress in Hormone Research*. 54: 394.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi reproduksi pada ternak. Angkasa. Bandung.
- Tuminah, S. 2004. Teh (*Camellia sinensis* O.K. var. *Assamica* (Mast)) sebagai Salah Satu Sumber Antioksidan. *Cermin Dunia Kedokteran*. 144.
- Wang, C., A. Hsueh and G. Erickson. 1982. The role of cyclic AMP in the induction of estrogen and progesterin synthesis in cultured granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 25:73-83.
- Williams, C.J. and G.F. Erickson. 2012. Morphology and Physiology of the Ovary.
- Yang, C.S., J.Y. Chung, G. Yang, S.K. Chhabra and M.J. Lee. 2000. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J. Nutr.* 130: 472-478.



LAMPIRAN

### Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Preparat Histologi Ovarium

- a. Fiksasi jaringan dengan formalin 10% selama 24 jam.
- b. Dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95% dan alkohol absolut masing-masing selama 1,5 jam.
- c. *Clearing* menggunakan xylol I 1 jam, xylol II 1,5 jam dan xylol III 1,5 jam.
- d. *Embeding* menggunakan parafin cair suhu 56<sup>0</sup>C sebanyak 3 kali masing masing 1 jam.
- e. *Blocking* pada cetakan.
- f. *Sectioning*/ pemotongan dengan mikrotom dengan ketebalan 2-5 mikron.
- g. *Mounting* (perekatan) pada gelas obyek yang berlabel *Poly L lysine*.
- h. Tutup dengan *cover glass* menggunakan Canada Balsam
- i. Inkubasi 39<sup>0</sup>C selama 24 jam.
- j. Labeling.

(Sumber: Jusuf, 2009)

## Lampiran 2. Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Reseptor LH dengan Teknik Immunohistokimia

### Immunohistokimia

#### Staining Protocol

- a. PBS 10% 2x selama 5 menit
- b. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% selama 10 menit
- c. PBS 10% 2x selama 5 menit
- d. *Blocking Buffer Ultra V-Block* selama 5 menit
- e. Ab primer (*mouse* Ab monoklonal anti-reseptor LH) yang diencerkan dengan diluen (eter) perbandingan 1:20 selama 45-60 menit
- f. PBS 10% 2x selama 5 menit
- g. *Biotylated Link (Yellow drops)* Ab sekunder selama 30 menit
- h. PBS 10% 2x selama 5 menit
- i. Streptavidin (*Red drops*) selama 30 menit
- j. PBS 10% 2x selama 5 menit
- k. DAB (Diamino Benzidine) kromogen 2% selama 6-10 menit
- l. PBS 10% 2x selama 5 menit
- m. Aquadest selama 5 menit

(Sumber: Hsu *et al.*, 1981)

#### Counterstain

- a. *Metil-green* selama 5-15 menit
- b. Air mengalir selama 5 menit

### Lampiran 3. Penghitungan Dosis

Dosis efektif pada tikus 81mg/ kg BB secara peroral (Kao, *et al.*, 2000)

Sehingga dosis efektif untuk 100 gram tikus adalah:

81 mg/ 1000 gram tikus

8,1 mg/ 100 gram tikus

**Dosis I.** Diturunkan setengah dari dosis efektif

$0,5 \times 8,1 \text{ mg/ } 100 \text{ gram} = 4,05\text{mg/ } 100 \text{ gram tikus dalam } 1 \text{ cc aquadest}$

**Dosis II.** Dosis efektif

8,1 mg/ 100 gram tikus dalam 1 cc aquadest

**Dosis III.** Dinaikkan satu setengah kali dosis efektif

$1,5 \times 8,1 \text{ mg/ } 100 \text{ gram} = 12,15 \text{ mg/ } 100 \text{ gram tikus dalam } 1 \text{ cc aquadest}$

Lampiran 4. Siklus Birahi Tikus antara Kontrol dan Pemberian EGCG dengan Berbagai Dosis.

Kelompok		Hasil Swab Vagina						Panjang Fase	
		1	2	3	4	5	6	Folikuler	Luteal
K	1	D	D	P	D	D	E	2	4
	2	D	E	E	M	D	P	3	3
	3	P	M	D	D	E	D	2	4
	4	D	P	E	M	D	D	2	4
	5	P	M	D	D	P	P	3	3
	6	P	M	M	D	D	P	2	4
P1	1	M	P	E	E	M	D	3	3
	2	E	E	D	P	E	E	5	1
	3	M	E	E	E	M	D	3	3
	4	D	E	E	E	M	M	3	3
	5	D	D	E	E	E	E	4	2
	6	M	M	E	E	D	P	3	3
P2	1	D	D	M	D	D	D	1	5
	2	D	M	D	D	M	D	1	5
	3	D	D	D	P	P	E	3	3
	4	E	E	E	M	D	P	4	2
	5	E	E	E	M	D	E	4	2
	6	P	M	D	D	D	P	2	4
P3	1	D	D	D	P	P	P	3	3
	2	D	D	D	P	P	P	3	3
	3	D	D	D	D	D	P	1	5
	4	M	D	D	D	P	P	4	2
	5	P	M	P	E	D	D	3	3
	6	D	D	D	E	E	E	3	3



## Lampiran 5. Ekspresi reseptor LH Dianalisis dengan Uji Kruskal Wallis

Your trial period for SPSS for Windows will expire in 14 days.

```
GET
  FILE='C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav'.
DATASET NAME DataSet1 WINDOW=FRONT.
NPAR TESTS
  /K-W=EKSPRESI BY PERLAKUAN(1 4)
  /MISSING ANALYSIS.
```

### NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

### Kruskal-Wallis Test

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank
EKSPRESI	1	6	20,83
	2	6	13,75
	3	6	8,42
	4	6	7,00
	Total	24	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	EKSPRESI
Chi-Square	15,404
df	3
Asymp. Sig.	,002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 6. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P1 (dosis 4,05 mg/ 100 g).

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(1 2)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	1	6	8,92	53,50
	2	6	4,08	24,50
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	3,500
Wilcoxon W	24,500
Z	-2,403
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,015 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 7. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g)

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(1 3)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	1	6	9,50	57,00
	3	6	3,50	21,00
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-3,047
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 8. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara Kontrol dengan P3 (dosis 12,15 mg/ 100 g)

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(1 4)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	1	6	9,42	56,50
	4	6	3,58	21,50
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	,500
Wilcoxon W	21,500
Z	-2,868
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 9. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P1 (dosis 4,05 mg/ 100 g) dengan P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g)

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(2 3)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

### Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	2	6	8,25	49,50
	3	6	4,75	28,50
	Total	12		

### Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	7,500
Wilcoxon W	28,500
Z	-2,006
Asymp. Sig. (2-tailed)	,045
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,093 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 10. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P1 (dosis 4,05 mg/ 100g) dengan P3 (dosis 12,15 mg/ 100 g)

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(2 4)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	2	6	8,42	50,50
	4	6	4,58	27,50
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	6,500
Wilcoxon W	27,500
Z	-1,920
Asymp. Sig. (2-tailed)	,055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,065 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

Lampiran 11. Uji Mann-Whitney Membandingkan Ekspresi reseptor LH antara P2 (dosis 8,1 mg/ 100 g) dengan P3 (dosis 12,15 mg/100g)

NPAR TESTS

/M-W= EKSPRESI BY PERLAKUAN(3 4)  
/MISSING ANALYSIS.

## NPar Tests

[DataSet1] C:\Users\desi\Desktop\desi spss.sav

## Mann-Whitney Test

Ranks

	PERLAKUAN	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI	3	6	7,17	43,00
	4	6	5,83	35,00
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	EKSPRESI
Mann-Whitney U	14,000
Wilcoxon W	35,000
Z	-,721
Asymp. Sig. (2-tailed)	,471
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,589 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: PERLAKUAN

## Lampiran 12. Dokumentasi Kegiatan



Timbangan digital dengan skala gram untuk menimbang EGCG



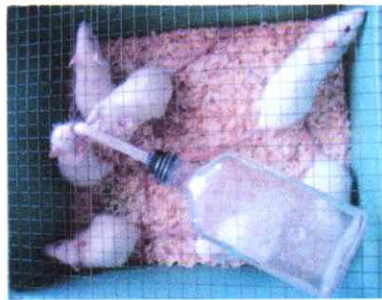
Mikroskop (Nikon) untuk memeriksa menentukan fase birahi



Sediaan EGCG (kiri) dan larutan EGCG pada berbagai dosis



Pemberian EGCG dengan sonde selama 7 hari



Pemeliharaan tikus (*Rattus norvegicus*)