

**TESIS**

**EFEKTIFITAS *CURCUMIN* PADA MENCIT (*Mus musculus*) PENDERITA ENDOMETRIOSIS EKTOPIK TERHADAP FERTILITAS**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**



**AULIA FIRMAWATI  
NIM : 090810472M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

**TESIS**

**EFEKTIFITAS *CURCUMIN* PADA MENCIT (*Mus musculus*) PENDERITA ENDOMETRIOSIS  
EKTOPIK TERHADAP FERTILITASI**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
pada Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga**

**Oleh :**

**AULIA FIRMAWATI  
NIM : 090810472M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
ILMU BIOLOGI REPRODUKSI  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2010**

**iii**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI  
Tanggal ....25 Agustus.2010.....

Oleh :

Pembimbing Ketua,



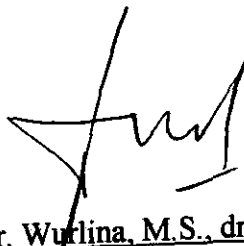
Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.  
NIP : 131 837 006

Pembimbing,



Dr. Widjiati, M.Si., drh.  
NIP : 131 877 882

Mengetahui,  
Kepala Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi  
Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wulina, M.S., drh.  
NIP : 131 257 033

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada  
Program Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga  
Pada tanggal 25 Agustus 2010

**Panitia Penguji**

**Ketua Pebguji : Prof. Dr. Ismudiono, M.S.,drh**

**Anggota : 1. Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.**  
**2. Dr. Widjiati, M.Si., drh.**  
**3. Dr. Dewa Ketut Meles, M.S., drh.**  
**4. Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh.**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Puji syukur kehadiran ALLAH SWT atas ridho dan karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **AKTIFITAS CURCUMIN PADA MENCIT (*Mus Musculus*) PENDERITA ENDOMETRIOSIS EKTOPIK TERHADAP FERTILITAS.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :  
Prof. Romziah Sidik, PhD., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh. selaku pembimbing pertama dan Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku pembimbing kedua sekaligus pembimbing penelitian yang telah membimbing dan memberikan masukan pada penelitian sampai penyusunan tesis berakhir.

Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku ketua penguji, Dr. Dewa Ketut Meles, M.S., drh. selaku sekretaris penguji dan Dr. Pudji Sianto, M.Kes., drh. selaku anggota penguji.

Dr. Hendy Hendarto, M.Kes., dr. yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk mengikuti penelitian. Seluruh staf Laboratorium Fertilisasi *in vitro* dan Histopatologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas bantuan teknik selama proses penelitian ini.

Prof. Dr. Wurlina, M.Kes., drh. Selaku Kepala Program Studi Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas

Airlangga serta seluruh staf pengajar dan staf kemahasiswaan Program Studi Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ayahanda Budiman, ST., Ibunda Tri Budi Sulistiani dan Adikku Ferdiansyah Septyanto yang telah memberi do'a, cinta, dan motivasi yang tak pernah surut hingga saat ini.

Kepada teman-teman tim penelitian Sonny Johari, dr.SpOG., Hernardi Hernadus, dr. atas semangat, do'a, kesabaran dan kerja samanya. Sahabatku Retno W.H, drh., Vaiga M, drh., Nurina T, drh., Suryo K, drh., Olan Rahayu, drh., Kholik, drh., Afik K, drh., Muhammad Mas'ud F, SKH dan teman-teman angkatan PS IBR 2008, PPDH Gelombang X dan KH 2003 yang telah memberi warna, motivasi dan kenangan selama menempuh perkuliahan, serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis meng harap kritikan dan saran dari pembimbing/penguji sebagai upaya penyempurnaan. Semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang berharga bagi dunia kedokteran umum dan hewan. Akhir kata penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya.

Surabaya, Agustus 2010

Penulis

## RINGKASAN

**AKTIFITAS CURCUMIN PADA MENCIT (*Mus Musculus*) PENDERITA ENDOMETRIOSIS EKTOPIK TERHADAP FERTILITAS**

Aulia Firmawati

Endometriosis ektopik adalah terdapatnya jaringan seperti endometrium yang berada di luar kavum uteri yang bias menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi kronis. Endometriosis ektopik merupakan salah satu penyakit ginekologi yang memberi dampak negatif pada fertilitas. Beberapa gangguan fertilitas yang disebabkan oleh penyakit endometriosis ektopik adalah gangguan folikulogenesis, penurunan kualitas oosit dan penurunan angka fertilisasi. Pengobatan yang efektif terhadap masalah fertilitas pada endometriosis ektopik sampai saat ini belum ditemukan. *Curcumin* merupakan salah satu pengobatan herbal tradisional yang berpotensi untuk mengobati endometriosis ektopik berdasarkan laporan beberapa peneliti. *Curcumin* merupakan bahan aktif yang diekstraksi dari *Curcuma longa*. Beberapa uji eksperimental telah berhasil menemukan mekanisme curcumin untuk mengobati endometriosis ektopik melalui mekanisme penekanan beberapa sitokin seperti TNF- $\alpha$ , NF-kB, dan COX-2. Aktifitas *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik sampai saat ini belum pernah diteliti secara komprehensif.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan aktifitas curcumin pada mencit penderita endometriosis ektopik untuk memperbaiki profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi.

Penelitian ini merupakan suatu studi eksperimental laboratorik, dengan lima perlakuan dan enam kali ulangan yang menggunakan mencit (*Mus musculus*) betina dengan umur 2-3 minggu, berat badan 20-30 gram sebagai hewan coba penelitian. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap penelitian yaitu tahap pertama adalah pemeriksaan kualitas oosit secara mikroskopis dan pengukuran kualitas oosit dengan menggunakan software Motic Image Plus 2.0, tahap kedua adalah pengamatan dan pemeriksaan angka fertilisasi secara fertilisasi *in vitro*, tahap ketiga adalah pemeriksaan profil folikulogenesis secara histopatologi dengan menggunakan pewarnaan Hematoxillin Eosin.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang disusun untuk membuktikan aktifitas *curcumin* untuk mengatasi masalah fertilitas (profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi) pada mencit penderita endometriosis ektopik. Uji beda dari data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variant* (ANOVA) pada data profil folikulogenesis perbedaan antar kelompok kontrol dengan perlakuan di uji dengan menggunakan uji LSD, sedangkan pada data hasil kualitas oosit dan angka fertilisasi perbedaan

antar kelompok kontrol dengan perlakuan di uji dengan menggunakan uji Tukey's HSD.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *curcumin* sangat efektif terhadap fertilitas yang meliputi profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi. Pada pengamatan profil folikulogenesis menunjukkan bahwa terdapat perpanjangan masa folikuler pada kelompok kontrol perlakuan dengan jumlah folikel primer dan sekunder yang lebih banyak dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol negatif. Sedangkan, pada kelompok perlakuan jumlah folikel tersier dan de graaf berkembang lebih banyak dibandingkan folikel primer dan sekunder. Pada pengamatan kualitas oosit, lebar zona pelusida pada kelompok perlakuan sedikit lebih tipis dibandingkan pada kelompok kontrol negatif dan keliling kumulus ooporus pada kelompok perlakuan sedikit lebih besar dibandingkan kelompok kontrol negatif. Pada pengamatan dan pemeriksaan angka fertilisasi jumlah embrio dua sel yang dihasilkan lebih banyak didapatkan pada kelompok perlakuan ke-3 dan 2, zygote lebih banyak didapatkan pada kelompok perlakuan ke-1 dan control negatif. Sedangkan, pada kontrol perlakuan tidak didapatkan oosit pada proses *ovum pick-up* sehingga tidak dapat dilakukan pemeriksaan dan pengamatan terhadap kualitas oosit dan angka fertilisasi.

Terdapatnya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol perlakuan dengan kelompok perlakuan dan kontrol negatif pada profil folikulogenesis ( $p < 0,05$ ). Pada pemeriksaan kualitas oosit dan angka fertilisasi terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). *Curcumin* memiliki peran modulasi beberapa sitokin pada mencit penderita endometriosis ektopik sehingga *curcumin* mampu mengurangi terjadinya apoptosis sel granulosa sehingga dapat memperbaiki profil folikulogenesis, meningkatkan kualitas oosit dan meningkatkan angka fertilisasi.

Kesimpulan penelitian ini adalah *curcumin* efektif mengatasi masalah fertilitas (profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi) melalui mekanisme modulasi beberapa sitokin salah satunya adalah TNF- $\alpha$ , NF-kB, dan COX-2 dengan adanya mekanisme modulasi tersebut maka *curcumin* dapat memperbaiki profil folikulogenesis, meningkatkan kualitas oosit dan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.

Penelitian ini merupakan laporan penelitian eksperimental laboratorik yang mengeksplorasi aktivitas *curcumin* pada mencit menderita endometriosis ektopik terhadap fertilitas. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi aktifitas *curcumin* dengan dosis yang lebih tinggi dar 48 mg/kg BB/hari pada mencit penderita endometriosis ektopik terhadap fertilitas, pengukuran kadar FS dan LH pada penderita endometriosis ektopik dan penilaian terhadap viabilitas embrio pada mencit penderita endometriosis ektopik pada proses fertilisasi *in vitro*.



## SUMMARY

### ACTIVITIES OF CURCUMIN ON FERTILITY IN THE AN ECTOPIC ENDOMETRIOSIS MICE (*Mus Musculus*)

**Aulia Firmawati**

Endometriosis is the presence of ectopic endometrial tissue, such as outside the uterine cavity that can cause chronic inflammatory reactions. Ectopic endometriosis is one of gynecological diseases that have a negative impact on fertility. Some fertility problems are caused by disease is a disorder of ectopic endometriosis folikulogenesis, the decline in oocyte quality and fertilization rates decline. Effective treatment of fertility problems in ectopic endometriosis, has not been found. Curcumin is one of the traditional herbal treatment that has the potential to treat an ectopic endometriosis based on reports by some researchers. Is the active ingredient of curcumin extracted from *Curcuma longa*. Several experimental tests have managed to find a mechanism to treat endometriosis ectopic curcumin through suppression mechanisms of several cytokines such as TNF- $\alpha$ , NF-kB, and COX-2. Activity of curcumin in mice ectopic endometriosis patients to date have not been investigated comprehensively.

This study aims to prove the activity of curcumin in mice ectopic endometriosis patients to improve the profile folikulogenesis, kavitasi oocytes and fertilization rates.

This research is a laboratory experimental study, with five treatments and six replications, using mice (*Mus musculus*) females with the age of 2-3 weeks, weight 20-30 grams of experimental animals in research. This research consists of three phases, namely the study's first phase is a microscopic examination of oocyte quality and oocyte quality measurement by using the software Motic Image Plus 2.0, the second is the observation and examination of the fertilization rate in vitro fertilization, the third stage is the examination of the histopathology folikulogenesis profile with using Hematoxylin Eosin staining.

The design of this study using completely randomized design arranged to prove the activity of curcumin to overcome fertility problems (folikulogenesis profile, oocyte quality and fertilization rates) in mice ectopic endometriosis patients. Different test results from the data were analyzed using Analysis of Variant (ANOVA) on the profile data folikulogenesis difference between the control group treated with the test using LSD test, while data on the results of oocyte quality and fertilization rate differences between the control group treated with the test with using Tukey's HSD test.

The results of this study indicate that curcumin is effective against that includes profiles folikulogenesis fertility, oocyte quality and fertilization rates. In observations folikulogenesis profiles indicate that there are follicular renewal in

the positive control group with the number of primary and secondary follicles greater than negative control and treatment groups. Meanwhile, in the treatment group the number of tertiary follicles and de Graaf developed more than primary and secondary follicles. In the observation of oocyte quality, wide zona pellucida in the treatment group a bit more sparse than in the negative control group and around the cumulus oophorus in the treatment group slightly larger than the negative control group. In the observation and examination of embryo fertilization rates of two cells produced more treatment groups were obtained on the 3rd and 2nd, more zygote obtained at the first treatment group and negative control. Meanwhile, the positive control showed no oocytes at ovum pick-up process so it can not be done inspections and observations on oocyte quality and fertilization rates.

The presence of a significant difference between positive control group with treatment group and negative control on folikulogenesis profile ( $p < 0.05$ ). On examination of oocyte quality and fertilization rates showed significant difference between the control group with treatment group ( $p < 0.05$ ). Curcumin has a role be some modulation of cytokines in endometriosis patients with ectopic mice that curcumin can reduce the occurrence of apoptosis of granulosa cells that can repair folikulogenesis profile, enhance and improve kaulitas oocyte fertilization rates.

The conclusion of this study is curcumin effectively cope with fertility problems (folikulogenesis profile, quality of oocyte fertilization rate da) through the mechanism of modulation is one of several cytokines TNF- $\alpha$ , NF-kB, and COX-2 with the modulation mechanism is the curcumin can improve folikulogenesis profile, improving the quality of oocytes and fertilization rates in vitro fertilization.

This study represents the first laboratory experimental research report which explored curcumin activity in mice suffering from an ectopic endometriosis on fertility. Further research is needed to explore the activity of curcumin with higher doses dar 48 mg / kg bw / day in mice on the fertility of ectopic endometriosis patients, measurements of FSH and LH levels in patients with ectopic endometriosis and assessment of embryo viability in mice ectopic endometriosis patients on the process in vitro fertilization.

**ABSTRACT****ACTIVITIES OF CURCUMIN ON FERTILITY IN THE A ECTOPIC  
ENDOMETRIOSIS MICE (*Mus Musculus*)****Aulia Firmawati**

Endometriosis is the presence of ectopic endometrial tissue, such as outside the uterine cavity that can cause chronic inflammatory reactions. Curcumin is one of the traditional herbal treatment. Several experimental tests have managed to find a mechanism to treat endometriosis ectopic curcumin through suppression mechanisms of several cytokines such as TNF- $\alpha$ , NF-kB, and COX-2.

This research is a laboratory experimental study, with five treatments and six replications, using mice (*Mus musculus*) females of experimental animals in research. This research consists of three phases, namely the study's first phase is a microscopic examination of oocyte quality, the second is the observation and examination of the fertilization rate in vitro fertilization, the third stage is the examination of the histopathology folikulogenesis profile with using Hematoxillin Eosin staining.

The presence of a significant difference between P0 with treatment group and KN on folikulogenesis profile ( $p < 0.05$ ). On examination of oocyte quality and fertilization rates showed significant difference between the control group with treatment group ( $p < 0.05$ ). Curcumin has a role be some modulation of cytokines in endometriosis patients with ectopic mice that curcumin can reduce the occurrence of apoptosis of granulose cells that can repair folikulogenesis profile, enhance and improve quality of oocyte, and fertilization rates.

The conclusion of this study is curcumin effectively cope with fertility problems through the mechanism of modulation is one of several cytokines TNF- $\alpha$ , NF-kB, and COX-2, the curcumin can improve folikulogenesis profile, improving the quality of oocytes and fertilization rates in vitro fertilization.

**Keywords :** Ectopic endometriosis, Curcumin, Folikulogenesis profile, Quality of oocyte, Fertilization rate.

## DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN .....	i
SAMPUL DALAM .....	ii
PRASYARAT GELAR .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
LEMBAR PENGUJI .....	v
UCAPAN TERIMAKASIH .....	vi
RINGKASAN .....	viii
<i>SUMMARY</i> .....	x
<i>ABSTRACT</i> .....	xii
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xvi
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xx
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	7
1.3. Tujuan Penelitian .....	7
1.3.1. Tujuan Umum .....	7
1.3.2. Tujuan Khusus .....	7
1.4. Manfaat Penelitian .....	8
1.4.1. Manfaat Keilmuan .....	8
1.4.2. Manfaat Praktis .....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Endometriosis.....	9
2.1.1. Definisi dan Teori Endometriosis.....	9
2.1.2. Keterkaitan antara Endometriosis, Cairan Peritoneum, dan Fungsi Immun .....	9
2.1.3. Perubahan Cairan Folikel Sebagai Fungsi Immunologis .....	13
2.1.4. Keterkaitan Fertilisasi dan Endometriosis .....	14
2.2. Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	15
2.2.1. Taxonomi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	15
2.2.2. Sistem Reproduksi Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	15
2.3. <i>Curcumin</i> .....	19
2.3.1. Farmakokinetik dan Efek Samping .....	21
2.3.2. Aktivitas Biologi .....	22
2.3.3. Target Molekul .....	25
2.3.4. Manfaat dan Fungsi <i>Curcumin</i> .....	26
2.4. Fisiologi Ovarium .....	29

2.4.1. Folikulogenesis .....	30
2.5. Oosit .....	32
2.5.1. Kualitas Oosit .....	34
2.6. Fertilisasi .....	35
2.6.1. Proses Fertilisasi .....	36
2.6.2. Angka Fertilisasi .....	39
2.7. Fertilisasi <i>in vitro</i> .....	39
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> ....	<b>41</b>
3.1. Kerangka Konseptual .....	41
3.2. Hipotesis Penelitian .....	45
<b>BAB 4 MATERI DAN METODE</b> .....	<b>46</b>
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	46
4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel .....	46
4.2.1. Populasi .....	46
4.2.2. Sampel .....	47
4.2.3. Besar Sampel .....	47
4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel .....	48
4.3.1. Variabel Penelitian .....	48
4.3.2. Definisi Operasional Variabel .....	48
4.4. Pelaksanaan Penelitian .....	50
4.4.1 Bahan Penelitian dan Alat Penelitian .....	50
4.4.2 Prosedur Penelitian .....	51
4.4.2.1. Tahapan Penelitian .....	51
4.4.2.1.1. Adaptasi mencit dan persiapan Penelitian .....	51
4.4.2.1.2. Pembuatan isolat endometriosis .....	52
4.4.2.1.3. Membuat mencit model endometriosis ...	52
4.4.2.1.4. Perlakuan .....	53
4.4.2.1.4.1. Isolat curcumin .....	53
4.4.2.1.4.2. Pemberian perlakuan .....	53
4.4.2.1.5. Uji fertilitas mencit model endometriosis dengan melihat profil folikulogenesis, kualitas oosit, dan angka fertlisasi pada proses fertilisasi <i>in vitro</i> .....	55
4.4.2.1.5.1. Profil folikulogenesis .....	55
4.4.2.1.5.2. Kualitas oosit .....	55
4.4.2.1.5.3. Angka fertlisasi .....	55
4.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	56
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>58</b>
5.1. Profil Folikulogenesis .....	58
5.1.1. Folikel Primer .....	59
5.1.2. Folikel Sekunder .....	61
5.1.3. Folikel Tersier .....	64

5.1.4. Folikel de Graaf .....	67
5.2. Kualitas Oosit .....	70
5.3. Angka Fertilisasi .....	72
5.3.1. <i>Unfertilized</i> .....	75
5.3.2. <i>Zygote</i> .....	75
5.3.3. Embrio Dua Sel .....	77
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>79</b>
6.1. Profil Folikulogenesis .....	79
6.2. Kualitas Oosit .....	92
6.3. Angka Fertilisasi .....	94
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>105</b>
7.1. Kesimpulan .....	105
7.2. Saran .....	106
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>107</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>112</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Efek disfungsional ovulasi mengakibatkan gangguan fertilitas .....	14
2. Data biologis mencit .....	18
5.1. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah folikel primer .....	59
5.2. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah folikel sekunder .....	62
5.3. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah folikel tersier .....	65
5.4. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah folikel de Graaf .....	68
5.5. Jumlah oosit, nilai rataan, dan simpangan baku pada kualitas oosit .....	70
5.6. Jumlah oosit, jumlah embrio, dan presentase angka fertilisasi yang terjadi selama 20-24 jam masa inkubasi dalam inkubator CO <sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C pada prose fertilisasi <i>in vitro</i> .....	74
5.7. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah oovum yang <i>unfertilized</i> .....	75
5.8. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah oovum yang <i>zygote</i> (embrio satu sel) .....	76
5.9. Hasil rataan dan simpangan baku pada perhitungan jumlah oovum yang embrio dua sel .....	77

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur anatomi mencit betina .....	18
2.2. Struktur kimia <i>curcuminoids</i> .....	21
2.3. Mekanisme kerja <i>curcumin</i> pada aktivasi <i>cytokine-induced</i> NF- $\kappa$ B.....	24
2.4. Target Molekul <i>Curcumin</i> .....	26
2.5. Proses Fertilisasi .....	38
3.1. Kerangka Konseptual .....	44
4. Kerangka Operasional Penelitian .....	57
5.1. Diagram nilai rataan folikel primer .....	60
5.2. Bentuk folikel primer pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. ....	61
5.3. Diagram nilai rataan folikel sekunder .....	63
5.4. Bentuk folikel sekunder pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. ....	64
5.5. Diagram nilai rataan folikel tersier .....	66
5.6. Bentuk folikel tersier pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. ....	67
5.7. Diagram nilai rataan folikel de Graaf .....	68
5.8. Bentuk folikel de Graaf pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. ....	69
5.9. Diagram nilai rataan kualitas oosit .....	71
5.10. Pengukuran keliling kumulus ooporus dengan menggunakan <i>Motic Image</i> <i>Plus 2.0</i> pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.....	72
5.11. Embrio dua sel, zygote dan <i>unfertilized</i> yang dihasilkan pada proses fertilisasi <i>in vitro</i> pada masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol selama 20-24 jam masa inkubasi.....	73
5.12. Diagram nilai rataan angka fertilisasi .....	74



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan Sediaan Histologi Ovarium Mencit Dengan Dengan pewarnaan <i>Hematoxyllin-Eosin</i> .....	112
2. Hasil Perhitungan Folikulogenesis SPSS XII <i>for Windows</i> .....	114
3. Hasil Perhitungan Kualitas Oosit SPSS XII <i>for Windows</i> .....	124
4. Hasil Perhitungan Angka Fertilisasi SPSS XII <i>for Windows</i> .....	127
5. Komposisi reagensia fertilisasi <i>in vitro</i> .....	134
6. Perhitungan dosis.....	135

## SINGKATAN ARTI DAN LAMBANG

BDMC	= <i>Bisdemethoxy Curcumin</i>
BNT	= <i>Beda Nyata Terkecil</i>
CO <sub>2</sub>	= <i>Carbon Dioxyda</i>
COC	= <i>Cumulus Oocyte Complex</i>
COX-2	= <i>Cyclo Oxygenase 2</i>
DMC	= <i>Demethoxycurcumin</i>
DW	= <i>Dionize Water</i>
E1	= <i>Estrone</i>
E2	= <i>Estradiol (estrogen)</i>
ESHRE	= <i>European Society for Human Reproduction and Embryology</i>
FK-UI RSCM	= <i>Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Rumah Sakit Cipto Mangunkusomo</i>
FSH	= <i>Folicle Stimulating Hormone</i>
GDF-9	= <i>Growth Differential Factor 9</i>
GnRH	= <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
GnSAF	= <i>Gonadotropin Surge Attenuating Factor</i>
GPx	= <i>Glutathione oxidase</i>
GSH	= <i>Glutathione</i>
GST	= <i>Glutathione S- Transferase</i>
i.m	= <i>intra muscular</i>
i.p	= <i>intra peritoneal</i>
ICAM-1	= <i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
IGF	= <i>Insulin like Growth Factor</i>
IGFBP4	= <i>Insulin Growth Factor Binding Protein 4</i>
IKK	= <i>IκB Kinase Complex</i>
IL-1,IL-8,IL-12	= <i>Interleukin 1, Interleukin 8, Interleukin 12</i>
IVF	= <i>In vitro Fertilization</i>
KN	= <i>Kontrol Negatif</i>
KP	= <i>Kontrol Positif</i>
LH	= <i>Leutinizing Hormone</i>
LSD	= <i>Low Significant Differential</i>
NaCl	= <i>Natrium Clorida</i>
NF- κB	= <i>Nuclear Factor kappa Beta</i>
NIK	= <i>NF-κB Inducing Kinase</i>
P1,P2,P3	= <i>Perlakuan 1, Perlakuan 2, Perlakuan 3</i>
PAPP-A	= <i>Pregnancy Associated Plasma Protein A</i>
PBS	= <i>Phosphat Buffer Saline</i>
PGE2	= <i>Prostaglandin E2</i>
RANTES	= <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>

RSU Dr. Soetomo	= Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo
SCID	= <i>Severe Combined Immunodeficient</i>
Sel NK	= <i>Sel Natural Killer</i>
SOD	= <i>Superoxide Dismutase</i>
SPSS	= <i>Statistica Product and Service Solution</i>
THC	= <i>Tetrahydrocurcumin</i>
TNF- $\alpha$	= <i>Tumor Nuclear Factor Alfa</i>
VEGF	= <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZP	= <i>Zona Pelucida</i>

BAB 1  
PENDAHULUAN

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Fertilitas pada hewan betina sangat erat hubungannya dengan angka fertilisasi, kedua hal tersebut tergantung pada proses folikulogenesis dan kualitas ovum, hal ini sangat membutuhkan koordinasi ovari. Beberapa kondisi tertentu dapat mengakibatkan terjadinya gangguan dalam folikulogenesis yang mengakibatkan terjadi infertilitas. Salah satu penyebab infertilitas yang utama adalah akibat kegagalan ovulasi. Keadaan lain penyebab infertilitas yang paling umum adalah terbentuknya jaringan endometrial pada bagian luar rongga uterus, keadaan inilah yang biasa kita sebut dengan endometriosis (Herliana *et al.*, 2008).

Berdasarkan data yang diperoleh dari RSUD Dr. Soetomo Surabaya menunjukkan adanya peningkatan kejadian endometriosis pada tindakan laparoskopi terhadap penderita infertilitas, yaitu pada tahun 1980 sebesar 35%, pada tahun 1990 meningkat menjadi 40% , sedangkan pada bagian Obstetri dan Ginekologi FK-UI RSCM Jakarta pada tahun 1990 sebesar 15,7% dan terakhir pada tahun 2000 meningkat mencapai 50% (Samsulhadi, 2002). Untuk kajian epidemiologi tentang endometriosis secara luas di Indonesia sampai saat ini belum banyak dilakukan.

Endometriosis merupakan masalah kesehatan yang diderita pada kurang lebih 10% wanita usia produktif, meningkat menjadi 20-50% pada wanita infertil dan pada babun (*Papio anubis*) dan juga monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) terjadi sebesar 85%. Pada babun (*Papio anubis*) dan kera

ekor panjang (*Macaca fasciculata*) yang dapat terjadi endometriosis dikarenakan pada kedua hewan tersebut mempunyai kesamaan dengan wanita dalam hal bentuk anatomis panggul, karakteristik fisiologis reproduksi dan imunologis (Grummer, 2006) juga mempunyai kesamaan dalam bentuk anatomis uterus, siklus menstruasi *retrograde*, dan pola ekspresi gen endometrium yang sebanding dengan manusia, serta dapat terjadi endometriosis secara spontan, walaupun tidak sesering seperti yang terjadi pada manusia (Splitterj *et al.*, 2004).

Berdasarkan laporan penelitian yang dilakukan oleh Splitterj *et al.*, (2004), kasus endometriosis terjadi pada empat monyet rhesus (*Macaca mulatta*), yang digunakan sebagai hewan model endometriosis dalam jangka waktu lama hingga pada akhirnya keempat monyet rhesus tersebut mengalami kematian setelah berumur delapan tahun. Pada monyet rhesus yang menderita endometriosis selain mengalami penurunan kesuburan juga angka konsepsi kelahiran, nyeri panggul juga tumbuhnya atau terjadinya proliferasi sel endometrium di lokasi ektopik seluruh organ kelamin betina. Endometriosis yang terjadi pada *non human primate* (seperti pada kera, monyet dan babun) dilaporkan sebagai kejadian yang spontan.

Pada tikus (*Rattus norwegicus*) dan mencit (*Mus musculus*) menunjukkan penurunan kesuburan dan terdapatnya nodul-nodul pada daerah panggul. Kista pada tikus dan mencit dengan bila dibandingkan dengan kista yang tumbuh pada wanita penderita endometriosis mempunyai respon yang sama pada proses steroidogenesis, dan kista tersebut menginduksi sintesis sitokin sel peritoneal,

cairan peritoneum dan zat abnormal lainnya yang sama seperti pada pertumbuhan endometrium ektopik pada wanita penderita endometriosis. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Berkley *et al.*, (2004), pada tikus endometriosis memperlihatkan adanya pertumbuhan jaringan ektopik yang tertanam dalam jumlah besar pada jaringan lemak dan jaringan ikat. Dan berdasarkan laporan penelitian yang dilakukan oleh Permana (2007) pada mencit terjadi penurunan fungsi limfosit, dengan mekanisme yang diduga karena terjadi penekanan pada proliferasi dan differensiasi limfosit juga adanya gambaran angiogenesis pada daerah uterus, ovarium dan dinding depan peritoneum juga didapatkan penurunan jumlah limfosit darah mencit. Ada empat klasifikasi stadium endometriosis : 1). Stadium I, stadium minimal didapatkan terjadinya angiogenesis pada daerah dinding depan peritoneum dan sedikit implantasi pada fase awal dari endometriosis pada paru, pleura, pericardium, dan sebagainya. 2). Stadium II, stadium ringan didapatkan adanya implantasi endometriosis yang lebih banyak dan lebih dalam. 3). Stadium III, stadium sedang didapatkan implantasi endometriosis yang lebih banyak hingga terjadi perlekatan ovarium, 4). Stadium IV, stadium berat didapatkan implantasi endometriosis yang sangat banyak sekali hingga terjadi perlekatan ovarium.

Sampai saat ini belum ada pengobatan terhadap endometriosis. Penanganan terhadap penderita endometriosis dengan pemberian preparat hormon maupun tindakan pembedahan, lebih bermanfaat untuk mengatasi nyeri daripada infertilitas (Speroff, 2005). Berdasarkan panduan *European Society for Human Reproduction and Embriology* (ESHRE) pengobatan medis supresi fungsi

ovarium untuk meningkatkan angka fertilisasi serta viabilitas embrio melalui perbaikan kualitas oosit juga folikulogenesis pada endometriosis tidak efektif dan seharusnya tidak dipakai sebagai pengobatan tunggal. Pada endometriosis terjadi gangguan folikulogenesis sehingga kualitas oosit terganggu, bila diberi obat supresi fungsi ovarium diduga akan lebih menekan fungsi oosit sehingga angka fertilisasi tidak akan membaik dan juga viabilitas embrio tidak akan tercapai dengan baik (Hendarto, 2007). Disamping itu terapi hormon yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan implan endometriosis dengan cara membuat suasana hipoestrogen seperti GnRH ternyata menyebabkan ovulasi tidak terjadi. Keadaan ini membuat penderita endometriosis tidak bisa hamil selama pengobatan. Ditambah lagi angka kekambuhan yang tinggi mencapai 45% setelah menyelesaikan terapi hormon juga masih menjadi masalah hingga saat ini. Oleh karena itu, para peneliti berusaha menemukan terapi baru untuk endometriosis dengan target molekul yang berbeda dengan efektivitas yang tinggi dan efek samping yang lebih sedikit (Nasu *et al.*, 2007).

Dewasa ini pengobatan herbal semakin populer digunakan untuk terapi beberapa penyakit dibidang ginekologi, misalnya endometriosis dan karsinoma ovarium. Hal ini dikarenakan obat-obatan herbal tidak mempunyai efek samping yang berarti dibandingkan dengan penggunaan obat-obatan sintesis yang beredar dipasaran selama ini. Beberapa peneliti melaporkan bahwa obat herbal mempunyai potensi untuk terapi endometriosis (Pari, 2008). Salah satu obat herbal tradisional yang digunakan untuk mengobati endometriosis adalah *curcumin* yang merupakan bahan aktif yang diekstraksi dari *Curcuma longa*,



dalam bahasa Inggris disebut dengan *turmeric* dan dalam bahasa Indonesia disebut dengan kunir. *Curcumin* merupakan pigmen kuning alami *turmeric*. Kandungannya sekitar 3-4% dari *turmeric*. Di Asia Tenggara telah digunakan selama beberapa abad sebagai bumbu masakan dan pewarna masakan. *Curcumin* juga telah terbukti dapat berfungsi sebagai anti inflamasi, anti oksidan, dan anti kanker. Beberapa uji eksperimental telah berhasil menemukan mekanisme *curcumin* untuk mengobati endometriosis yaitu melalui penekanan beberapa sitokin, hambatan COX-2 dan NF- $\kappa$ B (Wiesser *et al.*, 2007).

Endometriosis merupakan salah satu penyakit ginekologi yang memberi dampak negatif pada fungsi ovarium, tuba falopii dan kemampuan uterus menerima hasil konsepsi. Pengamatan pada proses fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan donor oosit menunjukkan hasil bahwa angka fertilisasi pada donor oosit yang berasal dari wanita penderita endometriosis lebih rendah dibandingkan dengan donor oosit yang berasal dari wanita tanpa endometriosis (Barnhart, 2002). Selain itu, pada penderita endometriosis terjadi penebalan matriks ikatan ekstraseluler penyusun *cumulus oophorus* (Herliana, 2008) juga apoptosis sel granulosa yang diduga sebagai penyebab terjadinya penurunan kualitas oosit. Hal ini berdampak pada rendahnya angka fertilisasi selain itu, pada penderita endometriosis juga didapatkan perpanjangan masa folikuler, pertumbuhan folikel yang rendah dan penurunan ukuran folikel dominan pada wanita endometriosis. Hal ini menunjukkan bahwa faktor oosit berperan besar pada kejadian infertilitas pada penderita endometriosis (Gupta, 2008). Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia

dengan memanfaatkan ovum maupun spermatozoa diluar tubuh hewan atau di dalam suatu media biakan (Arlotto, 1999). Faktor yang menunjang keberhasilan proses fertilisasi *in vitro* antara lain adalah kualitas oosit dan spermatozoa, proses pematangan oosit dan kapasitas spermatozoa. (Widjiati dkk., 2000).

Pada penelitian ini, digunakan hewan coba mencit sebagai model penelitian endometriosis yang disebut dengan mencit SCID (*Severe Combined Immunodeficient*). Menurut Awwad *et al.*, (1999) telah berhasil melakukan implantasi endometriosis pada mencit dengan angka keberhasilan 96,5%. Mencit tersebut diturunkan fungsi respon imunnya secara buatan dengan cara disuntik siklosporin A secara intramuskular sebelum disuntikkan jaringan endometrium wanita penderita endometriosis. Pada mencit ini akan terjadi penurunan fungsi limfosit, dengan mekanisme yang diduga karena terjadi penekanan pada proliferasi dan differensiasi limfosit. Permana (2007) telah membuktikan pada penelitian sebelumnya, pada mencit SCID endometriosis terdapat adanya gambaran angiogenesis pada daerah uterus, ovarium dan dinding depan peritoneum juga didapatkan penurunan jumlah limfosit darah mencit.

Mempertimbangkan hal tersebut diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui efektifitas pemberian *curcumin* terhadap pengobatan endometriosis. Sampai saat ini, belum pernah dilakukan penelitian tentang efektifitas pemberian *curcumin* pada mencit penderit endometriosis ektopik terhadap fertilitas.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan diatas, maka rumusan masalah yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini :

1. Apakah pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik dapat memperbaiki profil folikulogenesis dengan mengamati jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan folikel de Graaf ?
2. Apakah pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik dapat meningkatkan kualitas oosit berdasarkan keliling *cumulus oophorus*?
3. Apakah pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik dapat meningkatkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*?

### 1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini ada dua yaitu tujuan umum dan khusus :

#### 1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan *curcumin* sebagai pengobatan herbal bagi penderita endometriosis.

#### 1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut ini :

1. Membuktikan aktifitas *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik untuk memperbaiki profil folikulogenesis dengan mengamati jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan folikel de Graaf.
2. Membuktikan aktifitas *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik untuk meningkatkan kualitas oosit berdasarkan keliling *cumulus oophorus*.

3. Membuktikan aktifitas *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik untuk meningkatkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1. Manfaat Keilmuan**

Adapun manfaat dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai aktifitas *curcumin* dalam pengobatan endometriosis ektopik terutama dalam memperbaiki profil folikulogenesis, kualitas oosit, dan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.
- b. Hasil penelitian ini diharapkan mampu mendukung pengembangan tanaman obat Indonesia, khususnya untuk bidang reproduksi.

##### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memungkinkan untuk terbukanya kemungkinan terhadap penggunaan terapi *curcumin* pada penderita endometriosis dengan dukungan penelitian sebelumnya.

## BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA

## **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1. Endometriosis Ektopik**

#### **2.1.1. Definisi dan Teori Endometriosis**

Menurut *European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), 2006 definisi endometriosis ektopik adalah adanya jaringan seperti endometrium yang berada di luar kavum uteri yang bisa menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi kronis. Endometriosis ektopik merupakan penyakit yang kompleks berupa adanya jaringan endometrium ektopik di luar rongga uterus. Penyakit ini bersifat kronis dan progresif menimbulkan gejala yang bervariasi berupa *dismenore*, *disparenia*, infertilitas, dan nyeri panggul kronis (Samsulhadi, 2002). Manifestasi klinik endometriosis bermacam-macam dari ringan sampai berat, namun ada dua yang menonjol yaitu nyeri dan infertilitas yang sering kali progresif serta tingginya angka kekambuhan. Selain itu terdapat satu manifestasi klinis endometriosis bila sudah berlangsung lama yaitu kista endometrioma.

#### **2.1.2. Keterkaitan antara Endometriosis, Cairan Peritoneum, dan Fungsi Imun**

Cairan peritoneum pada penderita endometriosis lebih banyak dan didapatkan peningkatan reaksi inflamasi, meningkatnya kadar sel darah putih dan makrofag. Sel mononuklear yang teraktivasi bersamaan dengan sel endometriosis mensekresi berbagai sitokin. Sitokin adalah protein dengan berat molekul rendah atau glikoprotein yang disintesis oleh makrofag peritoneum, limfosit, implantasi

endometriosis atau sel mesotel dari peritoneum. Biasanya sitokin inflamasi dan *growth factors* disekresi pada saat pembersihan berbagai tipe sel yang ada di rongga peritoneum. Pada kasus endometriosis didapatkan ekspresi yang menyimpang dari beberapa sitokin yang disekresi oleh makrofag aktif pada cairan peritoneum seperti interleukin IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- $\alpha$ . Hal ini akan membentuk suatu lingkungan mikro yang menguntungkan bagi pertumbuhan endometriosis. Sitokin seperti IL-8 dan TNF- $\alpha$  diketahui dapat membantu proliferasi sel endometrium, adhesi endometrium, dan angiogenesis. Jadi tidak hanya makrofag tapi lesi endometriosis, sel mesotel peritoneum juga mensekresi sitokin seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 pada penderita endometriosis. Sitokin ini berperan sebagai modulator untuk menstimulasi sitokin lain seperti IL-8 yang juga dapat memicu terjadinya angiogenesis. Dan didapatkan korelasi yang positif antara stadium endometriosis dan kadar TNF- $\alpha$  pada cairan peritoneum. TNF- $\alpha$  dan IL-8 juga dilaporkan berhubungan dengan besar dan jumlah lesi endometriosis yang aktif. Meningkatnya kadar TNF- $\alpha$  menggambarkan besarnya aktivitas sekresi dari makrofag peritoneum (Kyama, 2003).

Penelitian pada babun ditemukan bahwa inflamasi peritoneal merupakan akibat terjadinya endometriosis dan bukan penyebab terjadinya endometriosis. Pada babun, *spontaneous retrograde menstruation* dan injeksi sel endometrium intrapelvik mengakibatkan terjadinya inflamasi peritoneum (didapatkan peningkatan volume cairan peritoneum dan peningkatan kadar sel darah putih dan sitokin cairan peritoneum). Efek inflamasi peritoneum ini di observasi selama satu bulan setelah injeksi endometrium intrapelvik, tapi menghilang setelah 2-3

bulan kemudian. Juga telah dilaporkan bahwa konsentrasi sel darah putih dan proporsi makrofag dan sel T sitotoksik meningkat pada cairan peritoneum babun yang menderita endometriosis spontan (Grummer, 2006).

Walaupun reaksi inflamasi peritoneum merupakan akibat dari terjadinya endometriosis, keberadaan endometriosis dan inflamasi peritoneum tetap membuka kesempatan bagi obat anti inflamasi sebagai pilihan terapi endometriosis. Studi awal yang dilakukan pada babun, pemberian agen immunosupresi dengan *azathioprin* dan *methylprednisolon* selama 3 bulan tidak memberikan efek terhadap insiden endometriosis spontan, perluasan endometriosis buatan dan progresivitas endometriosis spontan. Dapat disimpulkan secara keseluruhan tidak didapatkan efek pada insiden, prevalensi, dan derajat endometriosis. Juga tidak didapatkan bukti meningkatnya prevalensi endometriosis pada penderita yang menggunakan obat-obat immunosupresi jangka panjang. Tetapi agen anti inflamasi yang lebih spesifik kemungkinan mempengaruhi perkembangan endometriosis. Sebagai contoh obat yang menekan aktivasi makrofag seperti *verapamil* (*calcium channel blocker*) dan *pentoxifylline* telah dilakukan uji coba pada tikus dan hamster (Kyama, 2003).

Perubahan lingkungan cairan peritoneum penderita endometriosis akan berefek pada pertumbuhan, proliferasi, dan peradangan jaringan ektopik endometrium. Baik imunitas alamiah dan imunitas yang didapat sangat berperan dalam terjadinya endometriosis. Adanya anti bodi anti endometrial merespon agar tidak terjadi endometriosis. Berbagai hasil sel imunitas yang didapat seperti makrofag pada peritoneum akan mempengaruhi melalui jalur lokal



peradangan peritoneum. Hal tersebut mendukung implantasi sel ektopik endometrium. Limfosit T dan sel NK meningkat, dimana sel NK bertanggung jawab dalam pengenalan dan penghancuran dari menempelnya jaringan asing, sel tumor, dan sel-sel yang terinfeksi. Endometriosis menekan *cytotoxicity* sel NK dan leukosit sehingga mekanisme tubuh untuk menghambat progresifitas endometriosis menurun. Leukosit memproduksi sitokin dan faktor pertumbuhan, yaitu IL-1 $\beta$  akan merangsang RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) yang merupakan suatu *chemoattractant* bagi monosit dan sel T memori sehingga menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Kyama, 2003).

Peningkatan kadar E2 pada cairan peritoneum menstimulasi enzim *cyclo oxygenase-2* (COX-2) menghasilkan *prostaglandin* E2 (PGE2) yang merupakan stimulator penting pada ekspresi aromatase jaringan endometrium. Hal ini akan mendukung proliferasi dan pertumbuhan jaringan endometriosis. E2 dan PGE2 akan memberi umpan balik positif merangsang produksi COX-2 yang pada akhirnya akan mempertahankan jaringan endometriosis secara persisten (Gupta, 2008).

Pada kasus endometriosis, *Pregnancy Associated Plasma Protein-A* (PAPP-A) yang diproduksi oleh endometrium, ovarium, dan plasenta mengaktifkan protease dari *Insulin Growth Factor Binding Protein 4* (IGFBP4) yang secara normal akan menekan produksi E2 folikel. PAPP-A menurunkan IGFBP4 sehingga terjadi peningkatan kadar *Insulin like Growth Factor* (IGF) bebas yang akan bersinergi dengan *Foliceal Stimulating Hormone* (FSH). Sinergi

IGF dengan *Leutinizing Hormone* (LH) meningkatkan produksi androstenedion dan testosterone yang teraromatisasi atas pengaruh FSH menjadi E1 dan E2. Pada kondisi normal, konversi ini terjadi aromatasi didalam folikel. Endometriosis menurunkan aktifitas aromatasi tersebut, sehingga konversi terjadi didalam jaringan endometriosis. Adanya peningkatan aromatasi abnormal inilah yang menyebabkan bertahannya jaringan endometriosis (Kyama, 2003).

IL-6 adalah sitokin yang meregulasi proses peradangan dan sistem imun di peritoneum bersama aktifitas limfosit T dan limfosit B. IL-6 diproduksi stroma endometrium dan sel epitel karena respon dari estrogen yang terinduksi IL-1 dan TNF- $\alpha$ . Peningkatan kadar IL-6 dalam cairan peritoneum dapat mengganggu motilitas dari sperma. TNF- $\alpha$  diproduksi limfosit, Makrofag, dan sel NK endometriosis yang menyebabkan meningkatnya prostaglandin dan menginisiasi sitokin inflamasi serta meningkatkan daya tempel sel ektopik endometrium pada peritoneum (Gupta, 2008).

### **2.1.3. Perubahan cairan folikel sebagai fungsi imunologis**

Perubahan faktor inflamasi cairan folikel dan cairan peritoneal ditemukan peningkatan jumlah limfosit B, sel NK, dan sel monosit pada endometriosis, juga didapatkan peningkatan konsentrasi IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, dan TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  yang didapatkan meningkat di sel granulosa, menambah tingkat adhesi sel endometriosis kedalam lapisan mesotel peritoneum. Sitokin lainnya seperti IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, atau IL-1 $\alpha$  merangsang berbagai gangguan dalam siklus sel (Gupta, 2008).

Sitokin-sitokin yang dihasilkan sel darah putih dan ovarium memodulasi perubahan jalur enzim steroid ovarium. Endothelin 1 yang meningkat dalam cairan folikel adalah penghambat steroidogenesis sel granulosa tikus. IL-6 menurunkan aktifitas aromatase melalui jalur signal MAPK, mengakibatkan penurunan konversi androstenedion menjadi estron intrafolikular juga konversi androstenedion menjadi testosterone yang akan teraromatisasi menjadi E2. E2 yang rendah dalam folikel akan menjadikan masalah dalam fertilitas (Gupta, 2008).

Masalah lainnya adalah gangguan produksi *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) dan *Luteinizing Hormon* (LH) pada penderita endometriosis. Seperti diketahui adanya *Gonadotropin Surge Attenuating Factor* (GnSAF) yang dihasilkan oleh folikel kecil berperan dalam penurunan LH pasien endometriosis karena menghambat sensitifitas E2 untuk merangsang GnRh memproduksi LH.

**Ovulatory dysfunction → poor oocyte quality → reduced fertilization rate  
→ low grade embryos → reduced implantation rates.**

Tabel 2.1. Efek disfungsi ovulasi mengakibatkan gangguan fertilitas (Gupta, 2008).

#### 2.1.4. Keterkaitan Fertilitas dengan Endometriosis

Salah satu mekanisme terjadinya penurunan fertilitas adalah dengan adanya terjadinya gangguan kualitas oosit, folikulogenesis dan penurunan angka fertilisasi yang dilihat dari perlakuan IVF dimana oosit donor endometriosis lebih rendah angka fertilisasinya daripada oosit donor normal. Penyebab subfertil

berasal dari gangguan kualitas oosit, bukan karena perbedaan lingkungan oosit. Sutton, (2000) melaporkan bahwa oosit pada cairan folikel endometriosis yang akan dilakukan IVF mengalami hambatan mengikat spermatozoa dalam zona pellucida dibanding pasien dengan gangguan fungsi tuba. Hal ini diasumsikan bahwa terdapatnya ikatan matrik ekstraseluler yang lebih tebal dibandingkan dengan gangguan fertilitas lainnya.

## **2.2. Mencit (*Mus musculus*)**

### **2.2.1. Taxonomi Mencit (*Mus musculus*)**

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Veterbrata
Classis	: Mammalia
Subclass	: Theria
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

(Sumber : Zulfa, 2002)

### **2.2.2. Sistem Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Betina**

Sistem reproduksi betina pada mencit terdiri dari sepasang ovarium sebagai tempat untuk menghasilkan sel telur, oviduk sebagai saluran menuju

ke uterus serta tempat terjadinya fertilisasi, uterus duplex, servik uteri, vagina, vulva, kelenjar klitoral, klitoris, dan lima pasang puting. Pada umumnya setiap perubahan siklus birahi yang terjadi secara normal menunjukkan perubahan yang sifatnya teratur. Jarak antara birahi satu sampai birahi berikutnya disebut siklus birahi (Zulfa, 2002).

Birahi adalah saat dimana hewan betina bersedia untuk menerima pejantan untuk berkopulasi. Kopulasi itu merupakan awal dari terjadinya proses fertilisasi *in vivo* yang pada akhirnya dapat menghasilkan kebuntingan yang selanjutnya dapat menghasilkan anak (Partodiharjo, 1992). Pada umumnya siklus birahi pada mencit dapat dibagi dalam empat fase yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Perubahan-perubahan yang terjadi pada setiap fase dapat dilihat dari tingkah laku maupun dengan melihat perubahan vagina secara mikroskopis. Lama siklus birahi pada mencit antara 4-5 hari (Hafez, 1993).

Fase proestrus yang disebut dengan fase persiapan ditandai dengan adanya penambahan jumlah folikel. Pada mencit fase proestrus berlangsung selama 12 jam. Pada fase ini terjadi perubahan tingkah laku dan perubahan pada alat kelamin. Perubahan tingkah laku secara umum yaitu hewan mau didekati meskipun belum mau kopulasi. Perubahan pada alat kelamin luar nampak adanya peningkatan peredaran darah didaerah tersebut dan epitel vaginanya menebal (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

Fase estrus merupakan fase terpenting dalam siklus birahi karena dalam fase ini hewan mau menerima pejantan untuk kopulasi, hal ini

disebabkan karena pengaruh estrogen yang berasal dari ovarium sehingga menunjukkan pola tingkah laku yang khas pada berbagai hewan. Ovum mengalami perubahan kearah pematangan. Dalam fase ini folikel de Graaf mengalami pembesaran dan pematangan (Tolihere, 1985). Fase ini berlangsung selama kurang lebih 12 jam. Biasanya fase estrus ini dimulai jam 4 sore sampai jam 10 malam, biasanya hewan betina kawin dalam tiga jam pertama fase estrus. Terjadinya kopulasi ditandai dengan adanya sumbat vagina selama 16-48 jam (Zulfa, 2002).

Fase metestrus merupakan fase yang terjadi setelah fase estrus selesai. Pada mencit biasanya berlangsung selama 21 jam. Gejala luar tidak tampak nyata namun masih terdapat sisa-sisa estrus. Meskipun gejala estrus masih nampak tetapi hewan tidak mau menerima pejantan untuk menerima aktivitas kopulasi. Pada ovarium terjadi pembentukan korpus hemoragikum pada tempat folikel de Graaf melepaskan ovum. Kelenjar endometrium menjadi lebih panjang dan diberbagai tempat mulai berkelok-kelok. Kelenjar-kelenjar merubah sifat sekresinya dari cair menjadi kental, dimana lendir kental ini berfungsi sebagai sumbat servik sehingga servik tertutup (Partodiharjo, 1992).

Fase diestrus merupakan periode terakhir dan paling lama dalam siklus birahi dan ditandai dengan tidak adanya aktivitas kelamin dan hewan dalam keadaan tenang. Periode permulaan diestrus, korpus hemoragikum mengkerut karena dibawah lapisan hemoragik ini timbul sel kuning sehingga dinamakan korpus luteum. Korpus luteum menjadi matang dan menghasilkan

progesterone. Pada akhir periode ini korpus luteum akan mengalami degenerasi. Fase ini pada mencit berlangsung selama 56 jam (Partodiharjo, 1992). Adapun gambar anatomi mencit betina dapat dilihat pada gambar 2 dibawah ini :



Gambar 2.1. Struktur anatomi mencit betina (<http://fix.coxmiami.edu.html>, 2009)

Dan data biologis mencit dapat dilihat pada gambar 3 dibawah ini :

Tabel 2.2. Data biologis mencit (Sarwono, 2009)

Lama hidup	: 1-2 tahun, bias sampai 3 tahun
Lama produksi ekonomis	: 9 bulan
Lama bunting	: 19-21 hari
Kawin sesudah beranak	: 1 sampai 24 jam
Umur disapih	: 21 hari
Umur dewasa	: 35 hari
Umur dikawinkan	: 8 minggu (jantan dan betina)
Siklus kelamin	: Poliestrus
Siklus estrus (birahi)	: 4-5 hari
Lama estrus	: 12-14 jam
Perkawinan	: Pada waktu estrus
Ovulasi	: Dekat akhir periode estrus, spontan
Fertilisasi	: 2 jam sesudah kawin
Berat Dewasa	: 20-40 gram jantan, 18-35 gram betina
Berat Lahir	: 0,5-1,0 gram
Jumlah anak	: Rata-rata 6, bisa 15
Perkawinan Kelompok	: 4 betina dengan 1 jantan
Kecepatan Tumbuh	: 1 gram/hari
Aktivitas	: Nokturnal (malam)

### 2.3. Curcumin

Kunyit (*Curcuma longa*.) merupakan bumbu masakan dan obat tradisional sejak 600 tahun sebelum masehi. Marcopolo melakukan perjalanannya ke Cina pada abad ke 13, menyebutkan tanaman kunyit (*Curcuma longa*.) merupakan golongan tanaman jahe (*Zingiberaceae*) banyak ditemukan di daerah tropis selatan Asia. Bahan utama kunyit adalah 2-5% Curcumin. Warna kuning yang ditimbulkannya berasal dari *Cucuminoid*. Kunyit (*Curcuma longa*.) secara luas dikonsumsi oleh Indian, Asia, dan Jepang. Indian memakai bahan ini sebagai pengobatan gangguan kandung empedu, anoreksi, batuk-batuk, luka diabet, kelainan hati, rematik, dan sinusitis. Kunyit dapat dioleskan pada kulit yang luka. Sekarang, kunyit dikenal luas sebagai bahan anti oksidan, anti tumor, anti radang, dan efek anti bacterial (Pari, 2008).

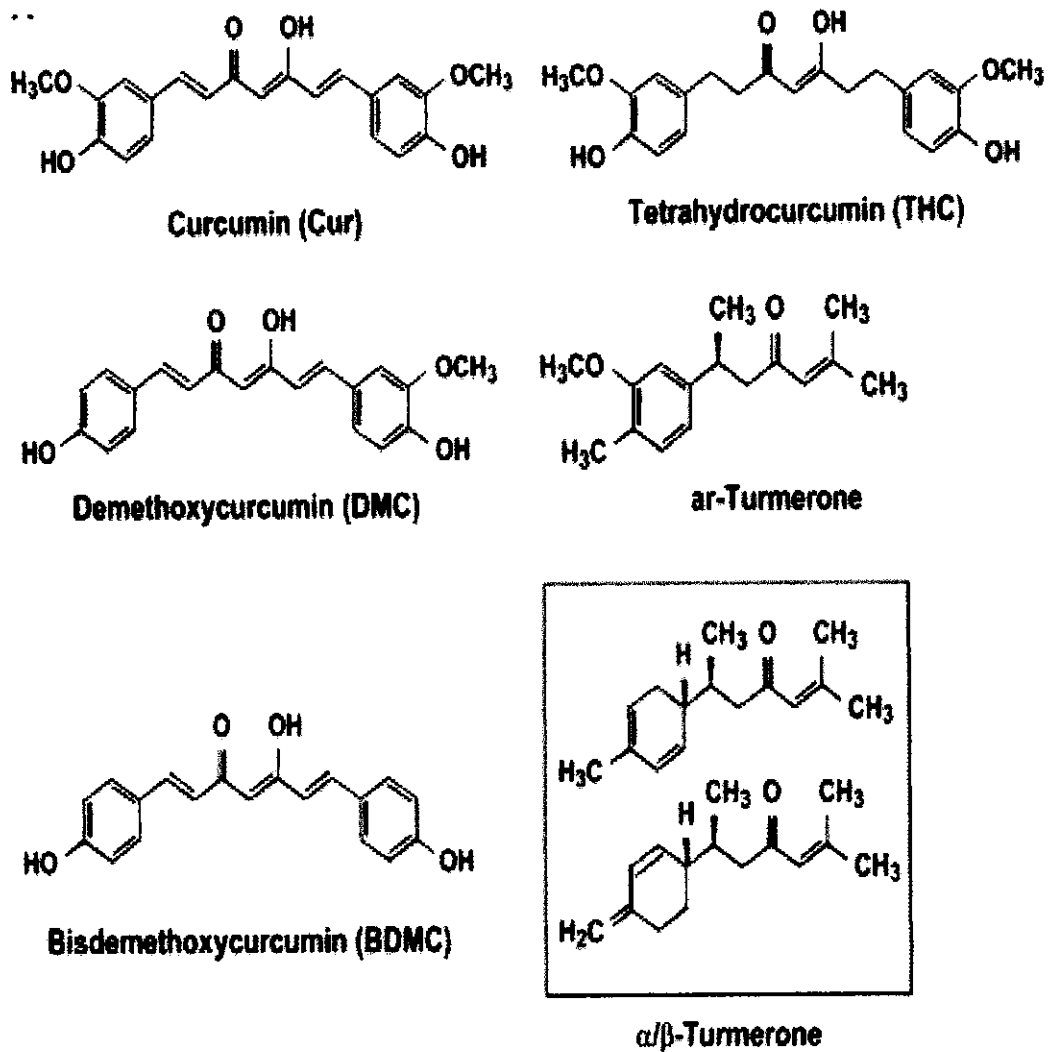
Pari, (2008) menyatakan bahwa bagian rizoma *curcumin* yang telah dikeringkan merupakan bahan kaya phenolic yaitu suatu *curcuminoid*. Tiga bahan kimia *curcuminoid* yang dapat di isolasi yaitu *curcumin*, *Demethoxycurcumin* (DMC = *curcumin* II), dan *Bisdemethoxy curcumin* (BDMC = *curcumin* III), serta baru-baru ini ditemukan *cyclocurcumin*. Sedangkan *Tetrahydrocurcumin* (THC) merupakan metabolit utama dari *curcumin*. Dipasaran, sediaan *curcumin* mengandung 77% curcumin murni, 17% DMC dan 3% BDMC. Sediaan *curcumin* adalah bubuk kristal berwarna kuning yang tidak larut dalam air maupun eter, tetapi dapat larut dalam ethanol, dimethylsulfoxide, dan aceton. Vogel adalah orang pertama yang berhasil mengisolasi *curcumin* pada tahun 1815. Struktur kimia *curcumin* diidentifikasi sebagai 1,6 *heptadiene*



3,5 dione 1,7 bis (4-hydroxy 3-methoxyphenyl) atau dikenal sebagai diferuloyl methane. Titik lebur pada suhu 183 °C, dengan nomer molekul C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> dan berat molekul 368,37. Selain curcuminoid, kunyit juga mengandung protein, lemak, mineral, karbohidrat, dan minyak esensial.

Weiiser, (2007) melaporkan adanya struktur etanol dalam molekul kurkumin yang berikatan dengan rantai hidrogen akan menambah kuatnya pembersihan radikal bebas. Aktifitas antioksidan dan reaksi radikal bebas pada *curcumin* dan *dimethoxycurcumin*, bahwa *curcumin* dapat menghambat peroksida lemak sebesar 82% dan *dimethoxycurcumin* 24%. Dari hasil penelitian tersebut dapat diketahui manfaat utama *curcumin* sebagai bahan anti oksidan.

*Curcumin* diketahui mempunyai efek anti-inflamasi melalui penekanan aktivasi *nuclear factor-κB* (NF- κB), efek anti-proliferatif melalui penekanan cyclin D1 dan produk gen anti-apoptosis, menginduksi pelepasan *cytochrome C*, aktivasi caspase dan p53 dan mempunyai efek anti-angiogenesis melalui *down-regulation Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Sandur *et al.*, 2007).



Gambar 2.2. Struktur kimia *curcuminoids* (Sandur *et al.*, 2007).

### 2.3.1. Farmakokinetik dan Efek Samping

Sandur *et al.*, pada tahun 2007 meneliti bahan *curcumin* pada tikus yang disuntikkan sebanyak 0,1 g/kg secara intra peritoneal, 15 menit kemudian didapatkan kadar *curcumin* dalam plasma sebesar 2,25  $\mu\text{g/mL}$  dan 1 jam kemudian didapatkan kadar 177,04  $\mu\text{g/mL}$  di usus halus, 26,06  $\mu\text{g/mL}$  di lien, 26,90  $\mu\text{g/mL}$  di hati, dan 7,51  $\mu\text{g/mL}$  di ginjal.

Weisser *et al.*, (2007) melakukan penelitian pada manusia dengan memberikan *curcumin* per oral 3600 mg - 8000 mg perhari selama empat bulan, tidak mendapatkan efek toksik kecuali mual-mual yang ringan dan diare. Hal ini menandakan bahwa *curcumin* yang di makan memiliki bioavaibilitas yang cukup tinggi. Adanya bahan metabolit dalam plasma dan urin menandakan *curcumin* diabsorpsi dengan baik dan juga terjadi metabolisme dalam sirkulasi tubuh.

### 2.3.2. Aktivitas Biologi

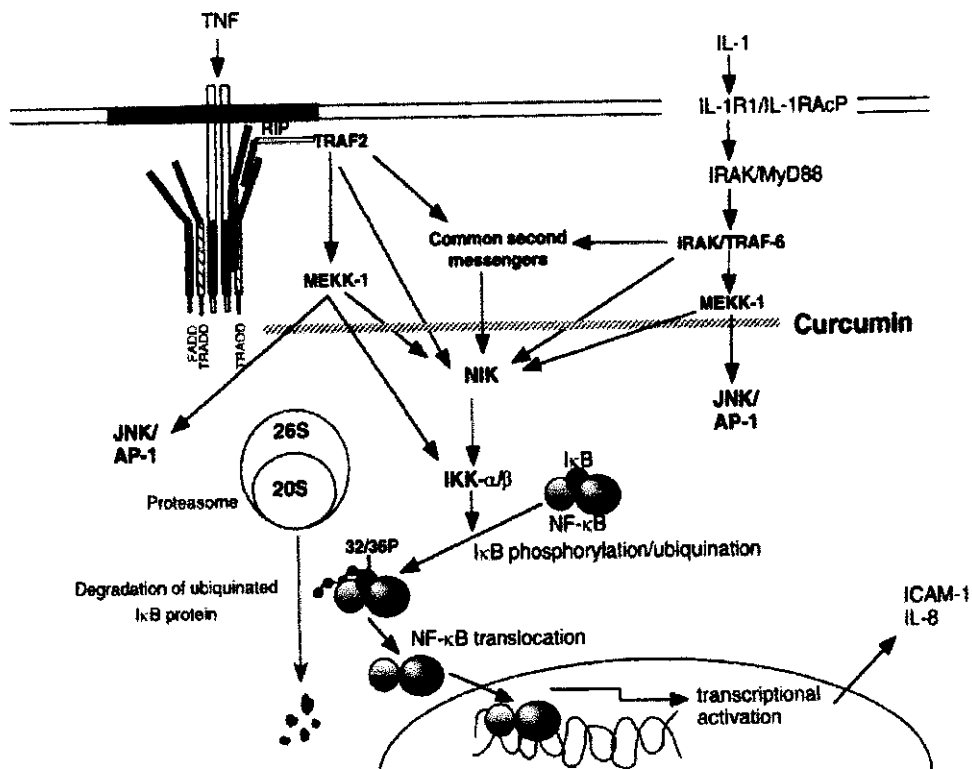
Sandur *et al.*, pada tahun 2007 menemukan bahwa *curcuminoids* mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menekan aktivasi NF- $\kappa$ B. *Curcumin* mengandung dua kelompok *phenyl methoxy*, DMC mengandung satu dan tidak didapatkan pada BDMC. Oleh karena *curcumin* merupakan bentuk yang paling aktif kemudian disusul dengan DMC dan BDMC dapat disimpulkan bahwa kelompok *phenyl-methoxyl* juga berkontribusi dalam penekanan aktivasi NF- $\kappa$ B. Bagaimana kelompok *penyl-methoxyl* tersebut dapat menekan NF- $\kappa$ B masih belum jelas.

Penekanan *DNA-binding activity* of NF- $\kappa$ B berhubungan dengan hambatan aktivitas reporte NF- $\kappa$ B dan dengan menekan NF- $\kappa$ B akan meregulasi produk gen COX-2, Cyclin D1 dan VEGF, *curcumin* paling efektif menekan produk gen tersebut dibanding DMC dan BDMC. Beberapa gen yang ikut terlibat dalam inisiasi imun, fase akut dan respon inflamasi di atur pada tahap transkripsi oleh NF- $\kappa$ B. Aktivasi NF- $\kappa$ B diatur secara ketat oleh penghambat endogen I $\kappa$ B, yang berupa suatu kompleks dengan NF- $\kappa$ B di sitoplasma. Dengan adanya stimulasi

dari sitokin, I $\kappa$ B akan mengalami fosforilasi dan akan mengalami degradasi oleh proteasome (Sandur *et al.*, 2007).

Fosforilasi I $\kappa$ B $\alpha$  melibatkan berbagai kinase yang berhubungan dengan cytokine-specific membrane receptor complexes akan mengaktifkan *NF- $\kappa$ B Inducing Kinase* (NIK). NIK yang aktif selanjutnya akan memfosforilase dan mengaktifkan *I $\kappa$ B Kinase Complex* (IKK). IKK merupakan bagian dari multiprotein kompleks yang mengandung subunit IKK- $\alpha$  dan IKK- $\beta$ , keduanya secara *in vitro* dapat memfosforilase *cytokines-induced I $\kappa$ B*. Aktivasi dari kompleks IKK akan mengakibatkan fosforilase dan degradasi I $\kappa$ B- $\alpha$  dan akan diikuti dengan terlepasnya NF- $\kappa$ B, kemudian akan bertranslokasi kedalam nukleus dan mengaktifkan transkripsi gen *multiple  $\kappa$ B-dependent*. Termasuk diantaranya TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 dan beberapa chemokines, MHC kelas II, ICAM-1, *inducible nitric oxidase synthase*, COX-2 (Jobin *et al.*, 1999).

*Curcumin* mampu menekan jalur NF- $\kappa$ B dan gen NF- $\kappa$ B *target cytokines*, Wieser *et al.*, (2007) mendemonstrasikan efek *curcumin* pada sel stroma endometriosis, *curcumin* menghambat induksi sitokin pro-inflammatory, sitokin angiogenik dan *macrophag migration inhibitory factor* oleh NF- $\kappa$ B pada model *in vitro*. Beberapa penelitian terbaru juga menyebutkan efek modulasi *curcumin* terhadap beberapa target molekul penting (TNF, IL-1, IL-6), beberapa faktor transkripsi (AP-1, Egr-1, *beta catenin* dan PPAR *gamma*), enzim (COX-2, iNOS), reseptor (EGFR dan HER2) dan sel siklus protein (cyclin D1, p21) (Wieser *et al.*, 2007)



Gambar 2.3. Mekanisme kerja *Curcumin* pada aktivasi *Cytokine-induced NF-κB* (Jobin *et al.*, 1999).

Beberapa obat terbaru endometriosis yang pernah diteliti dengan target molekul NF-κB diantaranya thalidomide dan sulindac. Pada penelitian yang dilakukan Yagyu *et al.*, pada tahun 2005, melaporkan thalidomide dapat melemahkan ekspresi mRNA dan protein IL-8 melalui penekanan aktivasi NF-κB yang di induksi oleh TNF-α. TNF-α juga menunjukkan dapat menginduksi produksi IL-8 pada jaringan endometriosis dan aktivasi NF-κB diduga terlibat dalam induksi IL-8 pada jaringan endometriosis (Yagyu *et al.*, 2005). Wieser juga melaporkan efek sulindac terhadap ekspresi RANTES melalui hambatan pergeseran subunit NF-κB p65 dari sitoplasma ke dalam nukleus mengakibatkan penurunan transkripsi gen yang dimediasi oleh NF-κB (Wieser *et al.*, 2005).

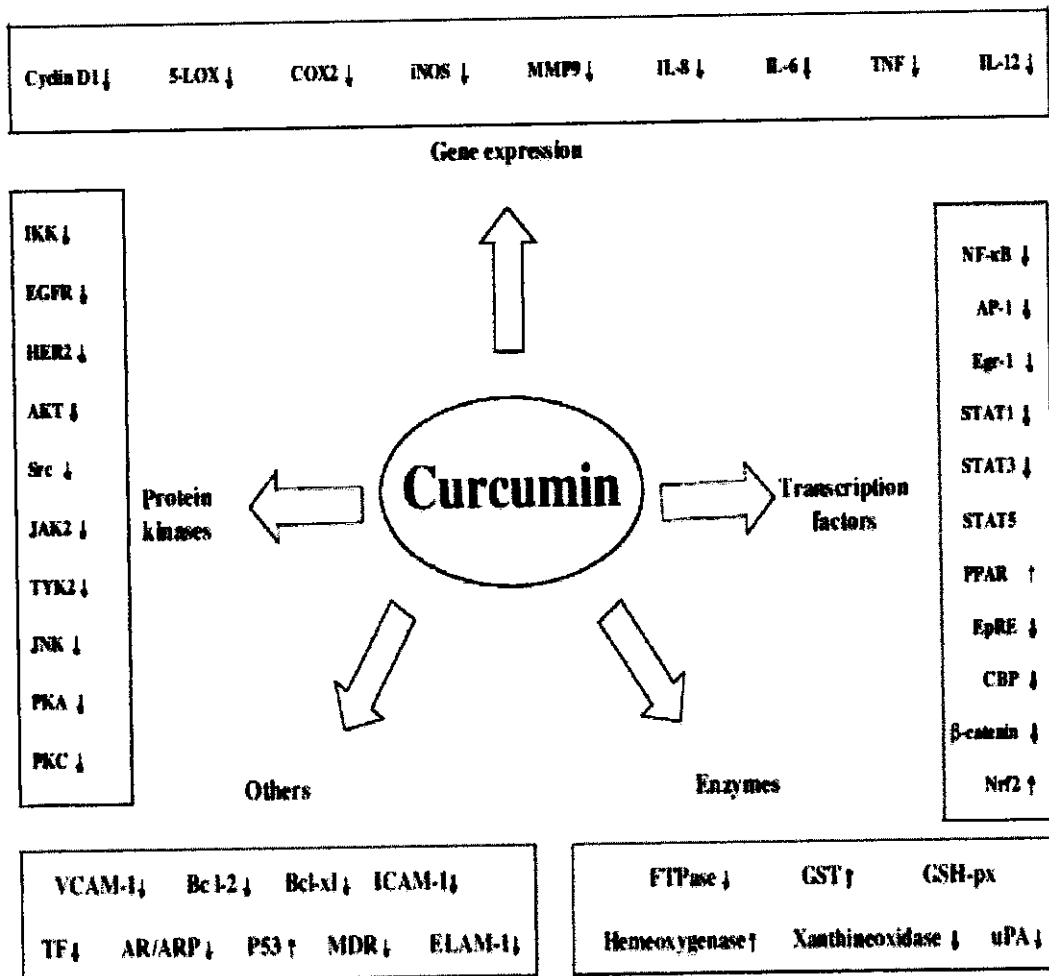
*Curcumin* juga dapat menginduksi terjadinya apoptosis dengan cara mempengaruhi p53, melepaskan sitokrom C, inhibisi jalur signal sel melalui Akt,

NF- $\kappa$ B, AP-1 atau JNK yang meningkatkan regulasi gen *growth arrest and DNA damage-inducible* (GADD), menurunkan ekspresi gen anti apoptosis seperti Bcl2 dan Bcl-Xl. *Curcumin* juga menunjukkan efek imunomodulator dengan mengaktivasi sel *Natural Killer* (NK). *Curcumin* juga mempunyai efek yang lain sebagai anti *carcinogenesis*, inhibisi transkripsi COX (*Cyclooxygenase*), efek anti oksidan dan efek anti angiogenesis. Pada tulisan ini kami batasi pembahasan pada *curcumin* sebagai anti angiogenesis (Sharma *et al.*, 2005; Joe *et al.*, 2008).

Angiogenesis merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai enzim, kaskade sinyal transduksi yang berfungsi fibrinolisis, matriks remodeling, inflamasi, kontrol hemodinamik dan regulasi pertumbuhan. Aktivasi dari jalur ini akan menghasilkan produk molekul proangiogenik. Meningkatnya VEGF dan angiopoitin merupakan regulator utama pada preoses angiogenesis dan normal dan patologis. Laporan terbaru mengenai aktivitas anti-angiogenik *curcumin* dengan menurunkan regulasi VEGF mRNA pada sel endotel. Faktor transkripsi AP-1 sangat penting untuk ekspresi VEGF. *Curcumin* diketahui menghambat ikatan faktor AP1 pada domain DNA. Jadi *curcumin* dapat menghambat ekspresi VEGF melalui hambatan pada AP1. Inhibisi angiogenesis oleh *curcumin* (>10 $\mu$ M) terbukti *in vitro* dengan menggunakan model kornea mencit (Pari, 2008).

### 2.3.3. Target Molekul *Curcumin*

Dari berbagai penelitian, diketahui beberapa target yang dapat dimodulasi oleh *curcumin*. Diantaranya adalah factor pertumbuhan, reseptor pertumbuhan, sitokin, enzim, dan gen yang meregulasi apoptosis.



Gambar 2.4. Target Molekul *Curcumin* (Pari, 2008).

### 2.3.4. Manfaat dan Fungsi *Curcumin*

Pengobatan tradisional bangsa Indian memakai *curcumin* dalam berbagai bentuk sediaan seperti obat topikal, diminum, dan secara inhalasi. Di Amerika, *curcumin* digunakan sebagai bahan pewarna keju, bumbu masakan, mustard, sereal, kripik kentang, acar, sup, es krim, dan yogurt.

Lebih dari 1700 tulisan yang di publikasikan selama 50 tahun, manfaat *curcumin* adalah : menurunkan kadar kolesterol darah, mencegah oksidasi LDL, penghambat agregasi trombosit, mencegah trombosis dan infark miokardial,

menekan gejala penyakit diabetes tipe II, pengobatan rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, penyakit alzheimer, menekan replikasi HIV, mempercepat penyembuhan luka, mencegah kerusakan hati, meningkatkan sekresi kandung empedu, mencegah katarak, mencegah toksisitas dan fibrosis paru, sebagai anti leishmaniasis, dan bahan anti sklerotik, serta *curcumin* merupakan bahan potensial dalam pencegahan dan terapi dari berbagai penyakit keganasan (Nurrochmad dan kawan-kawan, 2004).

Adapun beberapa fungsi *curcumin* adalah sebagai berikut ini :

#### **1. *Curcumin* sebagai bahan anti inflamasi**

Nurrochmad dkk., (2004) menampilkan kemampuan *curcumin* dalam menekan aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga terjadi hambatan ekspresi dari COX2 dan MMP9 di kondrosit persendian. Meluasnya penelitian *curcumin* sebagai anti inflamasi karena efek stimulasi sistem imun yang memodulasi aktivasi sel T dan sel B, makrofag, neutrofil, sel NK, dan sel dendritik, serta menurunkan regulasi dari berbagai faktor inflamasi seperti sitokin dan kemokin, juga meningkatkan respon antibodi.

#### **2. *Curcumin* sebagai bahan anti oksidan**

Adanya pemutusan rantai atau penambahan rantai hidrogen pada struktur phenolic menyebabkan *curcumin* dapat berfungsi sebagai anti oksidan. *Curcumin* menghambat induksi besi terhadap peroksidase lemak., yaitu suatu ROS dan oksidasi dari ion Fe. Beberapa studi *in vitro* dan *in vivo* terhadap penyakit keganasan, *curcumin* menghambat peroksidasi lemak dan memperbanyak aktifitas dari antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione* (GSH),



*glutathione s-transferase* (GST), dan *glutathione oxidase* (GPx). Kita ketahui bahwa peroksidase lemak sangat berperan dalam proses peradangan, penyakit jantung dan keganasan. Pada kenyataannya, *curcumin* 10 kali lebih kuat sebagai antioksidan dibanding vitamin E (Nurrochmad dkk., 2004).

### 3. *Curcumin* sebagai bahan anti kanker

*Curcumin* diketahui mampu menekan transformasi, proliferasi, dan metastasis suatu tumor. Oleh karena efek meregulasi berbagai faktor transkripsi, faktor pertumbuhan, sitokin, protein kinase, dan berbagai enzim. Hal ini menghambat proliferasi sel kanker mulai dari berbagai fase siklus sel kanker dan merangsang apoptosis. Bahkan, *curcumin* memiliki kemampuan menghambat bioaktivasi karsinogen dengan menekan enzim sitokrom P450 dan merangsang aktivasi enzim detoksifikasi karsinogen fase II yang merupakan suatu *chemopreventive* bagi sel kanker (Nurrochmad dkk., 2004).

Aggarwal (2003), menetapkan *curcumin* sebagai *broad spectrum anti cancer agent* dan menyatakan *curcumin* sebagai bahan yang hebat sebagai pencegah dan terapi kanker, dimana dapat menekan inisiasi tumor, promotion, dan metastasis. Dibuktikan secara farmakologi pada percobaan klinis manusia, *curcumin* tidak menyebabkan efek toksis walaupun diberikan dosis lebih dari 10gram per hari.

### 4. *Curcumin* sebagai bahan anti angiogenesis

Nurrochmad dkk., (2004) menunjukkan bahwa *curcumin* menekan proliferasi *vascular endothelial cell in vitro* dan membuktikan bahwa *curcumin*

dapat memutuskan FGF2 dalam menginduksi respon angiogenik *in vivo*. Dari dua hal tersebut maka *curcumin* dikenal sebagai bahan anti angiogenesis.

#### 2.4. Fisiologi Ovarium

Ovarium mempunyai 2 fungsi utama :

1. Fungsi reproduktif dalam hal menghasilkan sel telur (ova)
2. Fungsi endokrinologis dalam menghasilkan hormon estrogen, progesteron dan relaksin

Dua komponen penting yang terjadi pada ovarium yaitu : folikel dan korpus luteum. Folikel pada ovarium berasal dari epitel benih yang melapisi permukaan ovarium. Tahapan pertama perkembangan folikel terjadi pertumbuhan pada waktu hewan betina dalam kandungan dan setelah lahir. dalam tahap ini terjadi pembentukan folikel primer yang berasal dari satu sel epitel benih yang membelah diri (Ismudiono, 1999).

Ovarium mempunyai permukaan licin pada waktu sebelum terjadinya ovulasi secara teratur, warnanya abu-abu sampai merah muda. Setelah mencapai masa remaja permukaan ovarium menjadi tidak rata karena terbentuk banyak folikel yang telah dewasa, serta adanya korpus luteum dan korpus albikan. Bentuk ovarium tergantung spesies hewan dan besarnya bertambah sesuai dengan bertambahnya umur maupun banyak anak yang dilahirkan (Hardjopranjoto, 1995).

Fungsi ovarium banyak dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti hormonal, genetik, musim, makanan, serta penyakit pada alat kelamin. Faktor

yang merangsang peranan penting dalam mengatur aktivitas ovarium adalah adanya pelepasan hormon gonadotropin seperti FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutenizing Hormone*) dari hipofisis anterior. Secara histologi ovarium terdiri dari kortek dan medulla. Kortek terdiri atas epitel dan kecambah, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel de Graaf, korpus luteum, korpus albikan dan tunjangan pengikat (Hardjopranjoto, 1995).

Folikel berasal dari epitel kecambah yang menyelimuti permukaan ovarium. Jumlah folikel yang berkembang selama siklus birahi dipengaruhi faktor-faktor seperti spesies hewan, fase reproduksi, keadaan lingkungan, umur, induk dan genetik. Dan perkembangan folikel menjadi folikel masak meliputi perubahan-perubahan pada besarnya, jumlah lapisan sel granulosa, pertumbuhan sel teka dan posisi sel telur yang dikelilingi oleh sel kumulus oophorus dan peningkatan volume cairan rongga folikel (Harjopranjoto, 1995).

#### 2.4.1. Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses perkembangan folikel. Dalam masa kehidupan fetus terdapat siklus pembentukan folikel, pemasakan dan atresia. Jumlah folikel pada masa fetus sebanyak enam juta folikel. Pada saat lahir folikel berjumlah dua juta folikel. Pada masa pubertas folikel berjumlah 300.000-400.000 folikel dan yang dimaturasi sebanyak 400 folikel. Dari 400 folikel ini , akan dilepaskan satu folikel pada tiap ovulasi (Liben, 2003).

Folikel mencapai kematangannya melalui tingkatan-tingkatan

perkembangan folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier dan folikel de Graaf. Folikel primer terdiri dari satu sel benih sel telur yang dikelilingi selapis sel folikel folikuler kecil. Lapisan tebal folikel ini berkumpul dibawah tunika albugenia (Toilihere, 1981). Pada folikel primer, ovum tidak terbungkus oleh membran vitelin (Partodihardjo, 1992).

Folikel sekunder bentuknya lebih besar, karena sel-sel granulosanya lebih banyak. Folikel ini biasanya terletak agak jauh dari permukaan ovarium. Selain itu ovumnya telah terbungkus oleh membran vitelin, dan diluar membran vitelin sudah terdapat membran yang lebih tebal yang disebut zona pellusida (Partodihardjo, 1992; Ismudiono, 1999).

Folikel tersier ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulosa, sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan ovarium. Perkembangan selanjutnya folikel akan membentuk suatu ruangan yang disebut antrum dan berisi cairan yang disebut cairan folikuler atau liquor folikuli (Partodihardjo, 1992).

Folikel de Graaf adalah folikel bentuk terakhir dan terbesar pada ovarium dan hanya terjadi beberapa hari menjelang esterus. Pada folikel de Graaf ovum terbungkus dengan massa sel yang disebut kumulus oopborus. Ovum bersama massa sel yang membungkusnya menonjol kedalam ruang antrum yang penuh dengan cairan folikuler.

Pada umumnya ovum ini terletak dibagian yang berhadapan dengan folikel yang akan pecah pada ovulasi. Beberapa lapisan yang membentuk folikel de Graaf adalah sel-sel granulosa, sel-sel ini juga menjadi kumulus

oophorus. Massa sel granulosa yang membungkus telur dan terletak paling dekat dengan ovum disebut corona radiata. Setelah sel-sel granulosa terdapat lapisan teka folikuli yang terdiri dari teka intema dan teka eksterna, selapis membran basal dan selapis membran tununan pengikat (Salisbury dan Van demark, 1985; Partodihardjo, 1992).

Untuk perkembangan folikel membutuhkan hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Lutenizing Hormone*). Sel granulosa mempunyai reseptor untuk hormon FSH sedangkan sel teka memiliki reseptor LH. Dibawah pengaruh hormon LH sel teka mampu mensintesis hormon androgen dalam bentuk androstendion dan testosteron, sedangkan sintesis hormon estrogen terjadi dari proses aromatisasi hormon androgen di dalam sel granulosa dibawah pengaruh FSH. Adanya reseptor LH pada sel granulosa menandai akhir stadium folikel tersier. Banyak folikel yang telah berkembang menjadi folikel tersier mengalami atresia, kecuali bila di dalam darah terdapat kadar hormon gonadotropin, terutama LH yang cukup tinggi, sehingga dapat mendorong folikel berkembang ke stadium pra-ovulasi (Liben, 2003).

## 2.5. Oosit

Widjiati dkk., (2004) menyatakan bahwa, sel telur atau ovum terbentuk pada proses oogenesis yang terjadi pada ovarium induk betina sejak awal embrio. Proses ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap proliferasi, tumbuh dan pematangan. Ovum ini terbentuk dari germinal primodial yang mengalami mitosis menjadi oogonium pada tahap proliferasi di dalam proses oogenesis. Oogonium

merupakan sel yang berdiri sendiri dan tidak diselimuti oleh sel lain.

Bentuk ovum mencit (*Mus musculus*) memiliki ciri-ciri yang sama dengan kebanyakan ovum mamalia. Volume sitoplasma sedikit, berisi nukleus dan bahan kuning telur yang terbungkus oleh selaput vitellin atau vitellus. Selaput vitellin dibungkus dengan sempurna oleh zona pelusida yang transparan. Diantara vitellin dan zona pelusida terdapat ruang sempit yang berisi cairan yang disebut ruang perivitellin (*perivitellin space*). Ruang perivitellin pada berbagai spesies hewan berbeda-beda, tergantung pada banyaknya kuning telur dan butir lemak yang dikandung sitoplasmanya (Toelihere, 1985). Setelah ovulasi, ovum biasanya diselubungi oleh lapisan sel kumulus yang berbentuk mahkota yang disebut *corona radiata* dan *Cumulus Oophorus Complex* (COC). Sel *cumulus oophorus* ini berfungsi sebagai pemberi makanan pada oosit selama pertumbuhannya. Pada beberapa spesies seperti kelinci, mencit, tikus, kucing, anjing, dan bajing, sel *cumulus oophorus* relatif tebal (Salisbury and Van Denmark, 1985).

Ada dua selaput yang membungkus oosit yaitu selaput vitellin yang ada, disebelah dalam dan zona pelusida disebelah luar. Selaput vitellin adalah suatu deferensiasi granula kortikal dari oosit yang mempunyai bentuk dan sifat yang sama dengan selaput plasma sel somatik. Selaput vitellin berfungsi untuk proses difusi serta pengangkutan aktif dari bahan biologik. Zona pelusida adalah selaput yang homogen dan semi permiabel, terbentuk dari glikoprotein yang berfungsi sebagai pelindung oosit dan absorpsi selektif terhadap ion-ion organik dan zat-zat metabolik seperti perubahan fisika kimia yang terjadi sewaktu ovulasi,

pembuahan dan perkembangan embrio (Toelihere, 1985; Hafez, 2000).

### 2.5.1. Kualitas Oosit

Kualitas oosit pada penderita endometriosis ditentukan berdasarkan kompleks lapisan *cumulus oophorus* (*Cumulus Oocyte Complex*) yaitu sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit dalam kondisi utuh (padat) atau tidak dan lebar zona pelusida. Pada penderita endometriosis salah satu penyebab terjadinya penurunan angka fertilisasi diduga karena adanya peningkatan ketebalan pada matriks ekstraseluler penyusun *cumulus* dan zona pelusida, hal ini menyebabkan spermatozoa mengalami kesulitan dalam melakukan penetrasi. Adapun klasifikasi untuk menentukan kualitas oosit (kualitas baik atau jelek), sampai saat ini kebanyakan masih menggunakan sistem ini.

Penentuan kualitas oosit secara morfologis menurut Suprihatin (2008) yang disadur dari Monk (1987), dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kualitas baik (kriteria A dan B), kriteria A adalah oosit yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa secara utuh lebih dari dua lapis. Kriteria B adalah oosit yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa tidak penuh kurang dari dua lapis. Kualitas jelek Kriteria C dan D, kriteria C adalah oosit yang tampak jelas berbentuk bulat tetapi tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Kriteria D adalah oosit yang bentuknya tidak bulat dan tidak dikelilingi oleh sel granulosa.

## 2.6. Fertilisasi

Fertilisasi atau pembuahan adalah peristiwa bersatunya sel telur dan sel mani sedemikian rupa sehingga menghasilkan sebuah sel baru yang disebut *zygote* (Hardjopranto, 1995). Hafez (2000) menyatakan bahwa, fertilisasi adalah bersatunya pronukleus jantan dan pronukleus betina sampai terbentuknya zigot. Fertilisasi adalah serangkaian kejadian pada peristiwa bersatunya sebuah spermatozoa dengan sebuah ovum yang diwakili dengan interaksi spesifik antara spermatozoa dengan sel telur (Deborah and Patricia, 1992). Interaksi ini melibatkan terdapatnya reseptor pada spermatozoa dan ovum. Ovum memiliki lapisan ekstraseluler yang terdapat pada kumulus dan zona pelusida yang mengandung beberapa glikoprotein.

Menurut Kurniati, dkk, (2006) fertilisasi adalah proses penyatuan atau peleburan inti sel telur (ovum) dengan inti sel spermatozoa membentuk makhluk hidup baru yang disebut dengan *zygote*. *Zygote* merupakan bentuk awal dari makhluk hidup yang berkembang melalui proses fertilisasi. Dari *zygote* akan berkembang menjadi embrio tahap dua sel, empat sel, morula, blastosis berlanjut dengan diferensiasi membentuk organ (*organogenesis*) hingga akhirnya menjadi fetus dan lahir.

Fungsi utama dari fertilisasi yaitu : 1). Fungsi reproduksi, dan 2). Fungsi perkembangan. Fungsi reproduksi memungkinkan perpindahan unsure-unsur genetik dari parentalnya. Fungsi perkembangan memungkinkan rangsangan pada sel telur untuk melanjutkan dan menyelesaikan proses pembelahan meiosisnya dan membentuk pronukleus betina yang akan melebur (*syngami*) dengan



pronukleus jantan (berasal dari inti spermatozoa) membentuk *zygote*. Jika fertilisasi tidak terjadi maka sel telur akan bertahan pada tahap metaphase II dan berdegenerasi tanpa melalui proses selanjutnya (Kurniati, dkk, 2006).

Fertilisasi merupakan suatu proses yang terdiri dari serangkaian langkah yang dimulai dengan penembusan lapisan terluar dari sel telur dan dilanjutkan dengan masuknya sel spermatozoa ke dalam sitoplasma pengikat dan pengaktif sel telur. Penggabungan dari sel telur dan sel spermatozoa yang tidak sejenis akan mengawali proses perkembangan embrio. Pengaktifan dari sel spermatozoa dan sel telur akan merangsang terjadinya proses fertilisasi.

### 2.6.1. Proses Fertilisasi

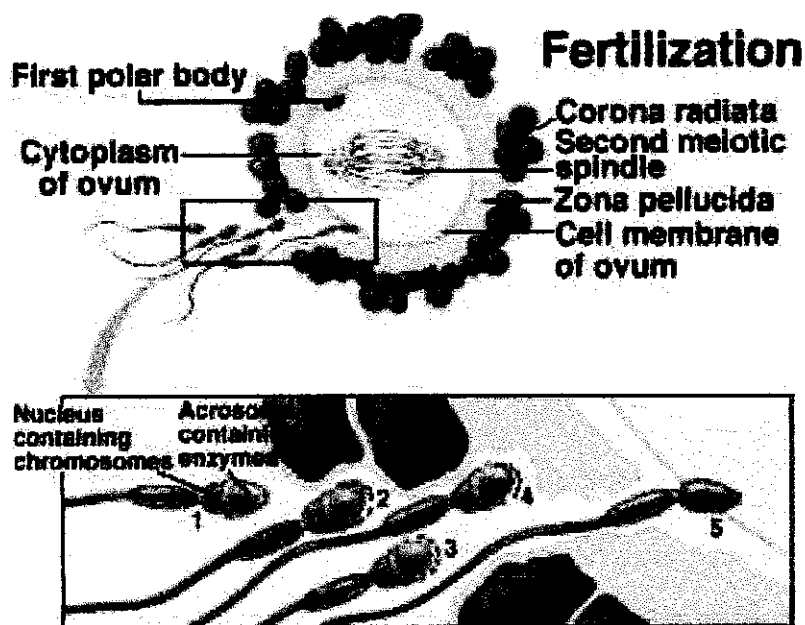
Saat terjadi ovulasi, oosit yang dilepaskan oleh ovarium terperangkap oleh fimbriae, selanjutnya akan masuk ke tuba falopii untuk bertemu dengan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi. Tempat pertemuan ovum dengan spermatozoa terjadi dibagian kaudal ampulla atau di sepertiga atas tuba falopii. Saat bertemu dengan spermatozoa ovum masih terbungkus oleh sel-sel granulosa yang dilepaskan oleh folikel de Graaf dan sel-sel tersebut adalah sel *cumulus oophorus* yang berasal dari folikel dan zona pelusida yang langsung menyelubungi oosit. Untuk dapat mencapai inti, spermatozoa harus menembus lapisan sel granulosa, zona pelusida dan membrane vitellin (Kurniati, dkk, 2006). Menurut Ismudiono (1999), proses fertilisasi memerlukan tiga kejadian kritis yaitu : 1). Spermatozoa harus menembus diantara cumulus, 2) spermatozoa harus

menyentuh dan menembus lapisan zona pelusida, 3) penyatuan spermatozoa dengan membrane plasma oosit (membrane vitellina).

Menurut Bearden dan Fuquay (1992), pada tahap pertama dari proses fertilisasi melibatkan penetrasi korona dan sel-sel cumulus oophorus oleh spermatozoa dengan mengeluarkannya enzim hyaluronidase yang akan mencerna asam hyaluronat yang terdapat diantara sel-sel cumulus. Asam hyaluronat ini dihasilkan oleh sel-sel granulose selama perkembangan di dalam folikel di ovarium. Setelah menembus sel-sel *cumulus*, spermatozoa berikatan dengan zona pelusida melalui ikatan semacam antigen-reseptor yang bersifat spesifik. Kedua enzim yaitu hyaluronidase dan akrosin tersebut berasal dari kepala spermatozoa (Kurniati dkk., 2006).

Pada tahap kedua, terjadi penetrasi spermatozoa pada zona pelusida, reaksi penetrasi spermatozoa pada zona pelusida ini menyerupahi reaksi antara antigen dengan reseptornya, dimana yang bertindak sebagai antigen adalah protein-protein yang ada pada membra plasma spermatozoa dan sebagai reseptornya adalah glikoprotein pada zona pelusida. Terdapat tiga jenis glikoprotein pada mamalia yaitu ZP1, ZP2, dan ZP3. Glikoprotein ZP1 berfungsi sebagai kerangka untuk berikatan dengan ZP2 dan ZP3. Glikoprotein ZP3 bertindak sebagai reseptor primer bagi ikatan spermatozoa-zona pelusida ikatan spermatozoa-ZP3 akan merangsang reaksi akrosom dan pengeluaran enzim-enzim hidrolitik. Enzim-enzim akan berperan dalam meluruhkan dan mencerna zona pelusida sehingga dapat ditembus. Selanjutnya spermatozoa akan melakukan penetrasi pada selaput vitellin dari ovum (Kurniati, dkk, 2006).

Kepala spermatozoa akan berfusi dengan selaput vitellin. Akrosin, merupakan suatu enzim yang menyerupahi tripsin pada kepala spermatozoa, membantu penetrasi dan membuat celah pada zona pelusida sebagai jalan masuk. Setelah spermatozoa masuk kedalam sitoplasma, terjadi reaksi zona. Ketika selaput plasma dari kepala spermatozoa berfusi dengan selaput vitellin, granula kortikal juga berfusi dengan selaput vitellin dan mengosongkan isinya ke dalam ruang perivitellin. Adanya reaksi zona dapat mencegah terjadinya penetrasi zona pelusida oleh spermatozoa (Bearden dan Fuquay, 1992). Thaler dan Cardulio (1995), menyatakan terjadinya fertilisasi akibat dari peristiwa molekuler kompleks yang pada akhirnya memungkinkan spermatozoa mengenali, mengikat dan berfusi dengan oosit. Adapun gambar proses fertilisasi dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 2.5. Proses Fertilisasi (<http://fix.coxmiami.edu.html>, 2009)

untuk tempat fertilisasi *in vitro* harus mendekati sama seperti kondisi lingkungan *in vivo* dalam saluran reproduksi hewan betina dan harus mempunyai kemampuan merangsang perkembangan embrio. Untuk mencapai kondisi media yang baik pada fertilisasi *in vitro* diperlukan beberapa syarat, yaitu kemurnia media, tekanan gas yang sesuai, suhu dan kelembaban.

Firmawati (2007), dalam penelitiannya menyatakan bahwa, fertilisasi *in vitro* membutuhkan sistem memanen oosit secara efisien dan tidak merusak oosit, pematangan inti, sitoplasma dan sel-sel *cumulus oophorus* dari oosit. Selain itu sistem kultur yang tidak merusak, sistem untuk kapasitas spermatozoa dan kondisi yang optimal untuk melakukan fertilisasi *in vitro* sangat diperlukan.

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEPTUAL DAN**  
**HIPOTESIS PENELITIAN**

## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1. Kerangka Konseptual

Pada penderita endometriosis terjadi aktivasi makrofag peritoneum yang mensekresikan berbagai sitokin pro inflamatori yang mengalami peningkatan antara lain TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, dan IL-13. Melalui mekanisme difusi atau interaksi parakrin sitokin inflamatori terutama TNF- $\alpha$  dalam jumlah yang tinggi pada penderita endometriosis akan masuk ke dalam folikel dan berikatan dengan *death receptor* di sel granulosa dan akan mengaktifkan inisiator *caspase cascade*. Kemudian pada akhirnya *caspase cascade* akan teraktifasi untuk melakukan transduksi intraseluler sinyal apoptosis pada granulosa.

GDF-9 (*Growth Differential Factor-9*) yang diproduksi oleh oosit akan menstimuli proliferasi dan diferensiasi sel granulose. Pada penderita endometriosis terjadi apoptosis sel granulose atau *Cumulus Oophorus Complex* (COC), hal ini menyebabkan terjadi gangguan pertumbuhan oosit yang ditandai dengan gangguan pertumbuhan folikel, proliferasi dan diferensiasi oosit. Secara tidak langsung hal ini berakibat pada terjadinya penurunan kadar GDF-9. Penurunan kadar GDF-9 menyebabkan proliferasi sel teka terganggu, sehingga menyebabkan terjadinya hambatan proses steroidogenesis melalui mekanisme hambatan aromatisasi androgen menjadi estrogen dan penurunan sensitifitas estrogen (E2) untuk memberi umpan balik ke hipofisa anterior agar GnRH memproduksi LH. Hal tersebut akan mempengaruhi maturasi oosit karena terjadi

pemanjangan masa folikular yang mengakibatkan terjadinya gangguan folikulogenesis.

Selain itu turunnya kadar sekresi GDF-9 pada kasus endometriosis ini menyebabkan oosit melakukan suatu respon adaptasi atau homeostatis terhadap kondisi tersebut dengan cara meningkatkan stimulasi produksi hyaluronan, yang selanjutnya dapat berakibat menjadi lebih banyak dan tebal ikatan matrik ekstraseluler pada kumulus dan zona pelusida sebagai kompensasi oosit untuk tetap mempertahankan diri dari stres mekanik. Hal ini akan mengganggu terjadinya ekspansi kumulus terutama penetrasi spermatozoa dengan oosit dan fertilisasi.

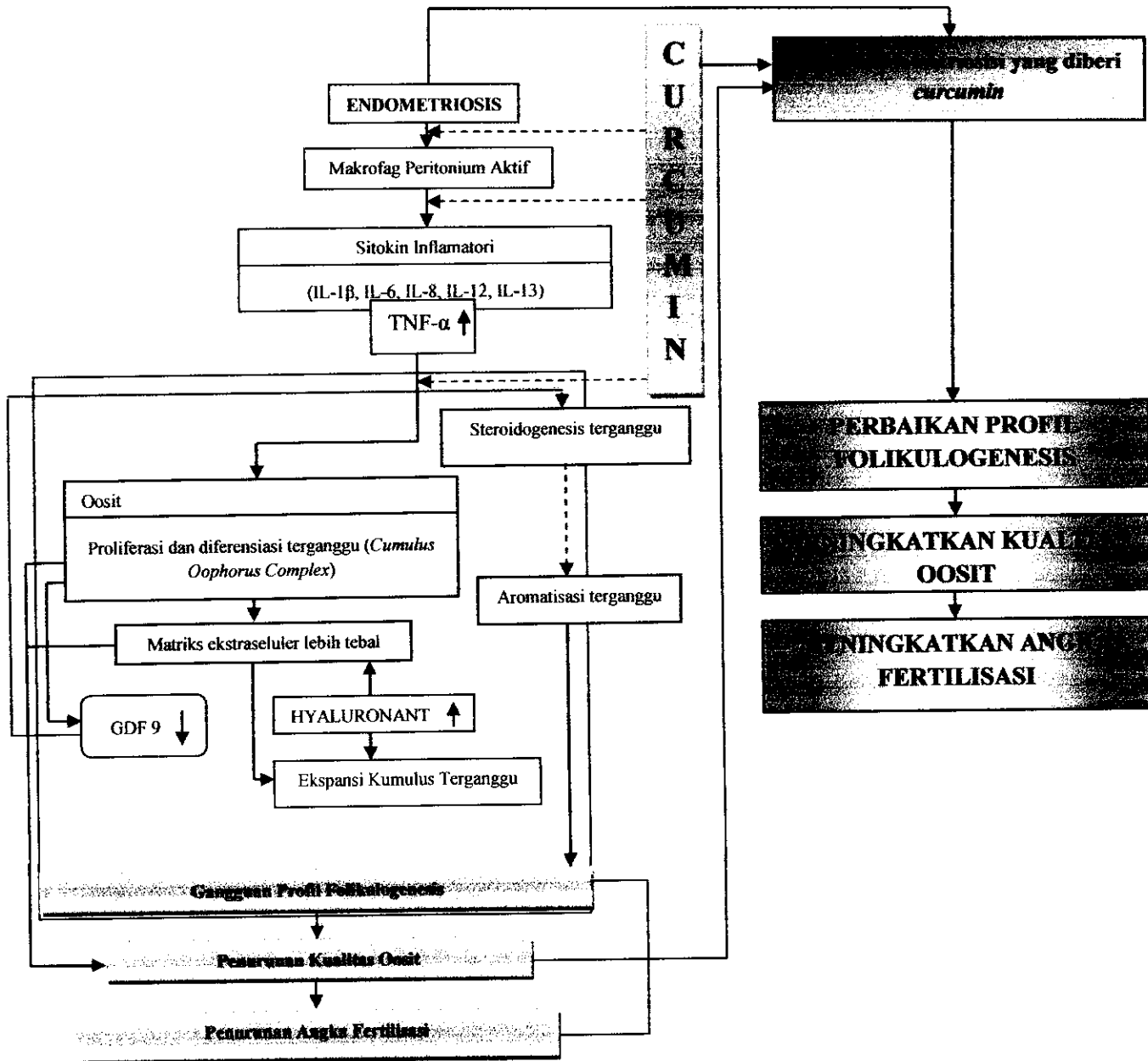
Terganggunya ekspansi kumulus yang merupakan salah satu proses penting dalam folikulogenesis. Ekspansi kumulus yang kaya hyaluronan (asam hyaluronan) berfungsi untuk :

- 1). Mengikat erat oosit dengan sel granulosa, sehingga aliran berbagai bahan untuk *meiotic competence* masuk ke oosit.
- 2). Melindungi oosit dari stress mekanik dan enzim proteolitik pada saat ovulasi.
- 3). Penetrasi sperma dan fertilisasi. Pada dasarnya semua proses abnormal yang terjadi pada sel granulosa, sel teka dan oosit tersebut diatas akan berdampak pada gangguan folikulogenesis, ovulasi dan fertilisasi sehingga berakibat pada turunya kualitas oosit yang berhubungan dengan tebalnya matriks ekstraseluler pada kumulus dan zona pelusida juga lebarnya ooplasma, dan secara langsung berakibat terhadap rendahnya angka fertilitisasi pada pasien endometriosis.

Fungsi *curcumin* pada kasus endometriosis adalah sebagai anti inflamasi dan anti oksidan. *Curcumin* sebagai anti inflamasi akan menghambat induksi


sitokin-sitokin *pro-inflammatory* seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 dan terutama TNF- $\alpha$  pada penderita endometriosis yang mempunyai efek toksik pada oosit, motilitas spermatozoa, interaksi spermatozoa-oosit dan juga perkembangan embrio melalui jalur penekanan aktivasi *Nuclear Factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B). *Curcumin* mempunyai efek modulasi terhadap beberapa target molekul penting yang terdapat pada penderita endometriosis seperti : TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12 dan enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *xanthine oxidase*. *Curcumin* sebagai antioksidan akan menurunkan kadar enzim *xanthine oxidase* yang berlebih dengan harapan dapat menurunkan terjadinya degenerasi maupun apoptosis oosit yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan perkembangan folikel atau profil folikulogenesis, kualitas oosit yang berpengaruh pada angka fertilisasi. Pada akhirnya dengan menggunakan pemberian *curcumin* pada penderita endometriosis atau hewan coba model endometriosis diharapkan dapat memperbaiki folikulogenesis, meningkatkan kualitas oosit dengan melihat keliling *cumulus oophorus* dan lebar zona pleusida dan meningkatkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*. Adapun kerangka konseptual ini dapat dilihat pada bagan dibawah ini :






Gambar 3.1. Kerangka Konseptual

**Keterangan :**

 : Variabel bebas

 : Variabel tergantung

 : Menghambat

 : Menstimuli

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini : Pemberian *curcumin* terhadap mencit penderita endometriosis ektopik dapat memperbaiki fertilitas yang dilihat berdasarkan profil folikulogenesis dengan mengamati jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf, meningkatkan kualitas oosit yang dilihat berdasarkan keliling *cumulus oophorus*, dan meningkatkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.

**BAB 4**  
**MATERI DAN METODE PENELITIAN**

## **BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN**

### **4.1. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *in vitro* dan pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya dengan waktu penelitian dilakukan selama tiga bulan yaitu pada bulan Juni-Agustus 2009.

### **4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel**

#### **4.2.1. Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) betina sebagai unit hewan coba laboratorium yang didapat dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Adapun kriteria subyek penelitian yang digunakan adalah mencit betina yang sehat, berusia 3 bulan dan belum pernah kawin (dara) dengan berat badan berkisar antara 20 – 30 gr dengan ciri-ciri bulu halus, mata bersinar, tidak pincang, tidak didapatkan adanya bekas luka dan belum pernah digunakan untuk penelitian lain. Sedangkan, mencit yang betina yang sakit, mati atau terjepit kandang setelah dilakukan perlakuan adaptasi selama 1 minggu di dalam kandang dan atau setelah mendapatkan suntikan siklosporin A, estradiol, jaringan endometrium wanita dan atau sonde *curcumin* termasuk dalam kriteria putus uji atau tidak dapat dilakukan pengujian selanjutnya.

#### 4.2.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini digunakan mencit sebanyak 30 ekor dengan rincian perlakuan sebagai berikut ini : digunakan mencit sebanyak 6 ekor sebagai kelompok perlakuan kontrol negatif (KN), mencit sebanyak 6 ekor sebagai kelompok perlakuan kontrol perlakuan (P0), mencit sebanyak 6 ekor sebagai kelompok Perlakuan 1 (P1) dengan pemberian *curcumin* sebesar 240 mg/kg BB, mencit sebanyak 6 ekor sebagai kelompok Perlakuan 2 (P2) dengan pemberian *curcumin* sebesar 360 mg/kg BB, mencit sebanyak 6 ekor sebagai kelompok Perlakuan 3 (P3) dengan pemberian *curcumin* sebesar 480 mg/kg BB. Dan mencit jantan yang telah divasektomi sebanyak 20 ekor untuk mengindus atau menggertak mencit betina agar terjadi ovulasi dan mencit jantan sebanyak 5 ekor untuk dikorbankan dan diambil spermanya lewat kauda epididimis.

#### 4.2.3. Besar Sampel

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

Dengan  $t = 5$ , maka didapatkan

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Oleh karena dari penelitian terdahulu didapatkan angka kegagalan 12,5% (Awwad, 1999) maka jumlah sampel dikoreksi dengan rumus  $16/(1-fail)$  dengan  $fail = 0,125 \rightarrow 4,75/(1-0,125) = 5,43 \rightarrow 6$

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah :

##### 1. Variabel bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *curcumin* yang diberikan kepada mencit model endometriosis.

##### 2. Variabel tergantung (*dependent variable*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

- a) Profil folikulogenesis, dengan sub variabel : Jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf.
- b) Kualitas Oosit, dengan sub variabel : Keliling *cumulus oophorus*.
- c) Angka fertilisasi, dengan sub variabel : Jumlah *zigote* pada proses fertilisasi *in vitro*.

#### 4.3.2. Definisi Operasional Variabel

1. Endometriosis adalah adanya jaringan seperti endometrium yang berada di luar kavum uteri yang bisa menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi kronis bisa menyebabkan infertilitas . Endometriosis pada mencit ditunjukkan dengan terjadinya angiogenesis dan peningkatan jumlah limfosit (Permana, 2007).
2. Mencit model endometriosis adalah mencit yang dibuat sedemikian rupa sehingga menyerupai fisiologis penderita endometriosis dengan cara

menurunkan system imunnya terlebih dahulu kemudian dilakukan pengimplanan jaringan endometrium dari penderita endometriosis.

3. *Curcumin* adalah bubuk kristal berwarna kuning yang tidak larut dalam air maupun eter, tetapi dapat larut dalam ethanol, *dimethylsulfoxide*, dan aceton dengan struktur kimia *curcumin* diidentifikasi sebagai 1,6 *heptadiene 3,5 dione 1,7 bis (4-hydroxy 3-methoxyphenyl)* atau dikenal sebagai *diferuloyl methane*. Berfungsi sebagai anti inflamasi, anti oksidan dan anti angiogenesis dengan target molekul diantaranya TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, dan NF- $\kappa\beta$ .
4. Profil folikulogenesis adalah gambaran proses terbentuknya folikel yang dilihat dari jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf pada kedua ovarium mencit model endometriosis dalam bentuk sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE.
5. Kualitas oosit adalah tingkat baik atau buruknya oosit untuk dapat dibuahi oleh spermatozoa. Kualitas oosit diklasifikasikan atas dua kelompok yaitu (A dan B) dan (C dan D). Kriteria A adalah oosit yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa secara utuh lebih dari dua lapis. Kriteria B adalah oosit yang tampak jelas, berbentuk bulat dan dikelilingi oleh sel granulosa tidak penuh kurang dari dua lapis. Kriteria C dan D, kriteria C adalah oosit yang tampak jelas berbentuk bulat tetapi tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Kriteria D adalah oosit yang bentuknya tidak bulat dan tidak dikelilingi oleh sel granulosa. Dan juga dilihat berdasarkan keliling *cumulus*.

6. Angka fertilisasi adalah jumlah sel telur mencit model endometriosis yang berhasil dibuahi oleh spermatozoa pada medium MEM pada proses fertilisasi *in vitro* setelah 20 jam di inkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub>. Indikator terjadinya fertilisasi adalah adanya badan kutub kedua.

#### 4.4. Pelaksanaan Penelitian

##### 4.4.1. Bahan dan Alat Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : *Natrium Chloride* (NaCl) fisiologis 0,9 % dengan merk Otsu-Ns (normal saline intravenous), *Diionize Water* (DW), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *MEM* , jaringan endometrium dari penderita kista di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, Penicillin, Streptomysin, Estradiol, *Curcumin* dengan dengan merk MERCK, siklosporin A dengan merk Sandiimun produksi Novartis dan *Mineral Oil* dengan merk Sigma (8042-47-5), Bahan-bahan lain terdiri dari : alkohol 70%, kertas tissue steril, dan aquades produksi PT. Ikapamidhon- Putra Mas.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut : pipet Pasteur, Eppendroff dengan merk Whatman 0,2 µmpp, cawan petri *disposable* ukuran 30 x 80 mm dengan merk FLACON. Cawan petri kaca dengan merk Nun, *sput disposable* dengan merk TERUMO SYRINGE 1 ml dan 5 ml, *laminar flow*, mikroskop *inverted* dengan merk MEIJI, *sentrifuge* dengan merk HETTICH, pembakar Bunsen, timbangan analitik dengan merk Dever Instruman, *incubator* CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5<sup>0</sup> C dengan merk *Cell House* (Quero *et all.*, 1999),



tabung reaksi, gelas beker, gelas ukur, pinset, gunting, botol steril ukuran kecil dan besar, jarum ukuran 21 G dan filter *milliphore*, sonde mencit.

#### **4.4.2. Prosedur Penelitian**

##### **4.4.2.1. Tahapan Penelitian**

Untuk membuktikan efektifitas pemberian *curcumin* pada mencit betina (*Mus musculus*) sebagai hewan coba model endometriosis terhadap proses folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro* maka tahapan penelitian yang harus dilakukan adalah sebagai berikut ini :

1. Adaptasi mencit dan persiapan penelitian
2. Pembuatan isolat endometriosis.
3. Membuat mencit model endometriosis.
4. Melakukan perlakuan.
5. Uji fertilitas mencit model endometriosis dengan melihat profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.

##### **4.4.2.1.1. Adaptasi mencit dan persiapan penelitian**

Sebelum melakukan penelitian dilakukan proses adaptasi mencit coba selama satu minggu di kandang yang bersih, cukup udara, cukup cahaya, makanan minuman yang cukup dan homogen. Setelah itu menyiapkan empat kelompok yang disuntik siklosporin A yaitu kontrol perlakuan, P1, P2 dan P3 dan satu kelompok yang tidak mendapat perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif.

#### 4.4.2.1.2. Pembuatan isolat endometriosis

Biopsi yang diambil dari bahan uterus tumor jinak, yang disimpan di PBS (*phosphate buffered saline*). Dilakukan *pencucian* 2 x menggunakan alat sentrifus dengan kecepatan 2500 rpm dan suhu 4°C. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan PBS, penicillin 200 IU/ml dan streptomisin 200 µg/ml. diambil dengan *syringe* 3 ml jaringan basah endometrium. Dosis yang diberikan pada mencit adalah 0,1 ml disuntikan secara intraperitoneal setara dengan 0,6 gram jaringan endometrium basah (Awwad, 1999).

#### 4.4.2.1.3. Membuat mencit model endometriosis

Pertama, mencit diturunkan sistem imunnya dengan menggunakan siklosporin A. Penyuntikan siklosporin A pada hari ke-1 secara intramuskular di daerah *musculus biceps femoralis* mencit. Sediaan obat siklosporin A tersebut yang tersedia di Indonesia tersedia dengan nama dagang Sandiimun produksi Novartis. Siklosporin A dalam sediaan satu ampul berisi 50 mg/ml dengan isi sebesar 5 ml, adapun dosis yang kita butuhkan adalah 10 mg/kg/hari. Dilakukan konversi dosis ke mencit dengan berat badan antara 20-30 gr, sehingga setelah dilakukan penghitungan mencit mendapatkan dosis konversi 1,8 mg/mencit. Sehingga dosis untuk mencit setelah pengenceran dengan *water for injection* 0,2 cc Sandiimun setelah diencerkan disuntikan secara intramuskuler. Kemudian dilakukan penyuntikan estrogen secara intramuskular pada *musculus biceps femoralis* pada hari ke-1 dan ke-5 setelah perlakuan penyuntikan endometrium wanita. Setelah itu dilakukan implantasi jaringan endometrium pada hari ke-1

dengan menyuntikan isolate endometrium secara intra peritoneal sebanyak 0,1 cc (Awwad, 1999).

#### 4.4.2.1.4. Perlakuan

##### 4.4.2.1.4.1. Isolat *curcumin*

Bahan *curcumin* dibeli dengan nama dagang MERCK yang mengandung bahan aktif *curcumin* 95%. Pada penelitian ini, untuk perlakuan 1 (P1) menggunakan 24 mg/kg BB *curcumin* yang dilarutkan dalam pelarut CMC Na 0,5% dari jumlah kandungan *curcumin* dalam tiap dosisnya sehingga total nisbah 1 ml, perlakuan 2 (P2) menggunakan 36 mg/Kg BB *curcumin* yang dilarutkan dalam pelarut CMC Na 0,5% dari jumlah kandungan *curcumin* dalam tiap dosisnya sehingga total nisbah 1 ml, perlakuan 3 (P3) menggunakan 48 mg/Kg BB *curcumin* yang dilarutkan dalam pelarut CMCNa 0,5% dari jumlah kandungan *curcumin* dalam tiap dosisnya sehingga total nisbah 1 ml.

##### 4.4.2.1.4.2. Pemberian Perlakuan

Uji profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi secara fertilitas *in vitro* pada mencit betina model endometriosis dilakukan dengan perlakuan sebagai berikut ini :

1. Kelompok Kontrol Negatif (KN) : Mencit tanpa perlakuan dilakukan superovulasi tanpa perlakuan dan kemudian dilakukan IVF untuk melihat kualitas oosit, setelah 20 jam dilakukan pengamatan angka fertilisasi, dan ovarium dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menghitung jumlah folikel.

2. Kelompok Kontrol Perlakuan (P0) : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *placebo* aquadest + CMCNa 0,5 % selama 14 hari kemudian dilakukan superovulasi, setelah itu dilakukan IVF untuk melihat kualitas oosit, setelah 20 jam dilakukan pengamatan angka fertilisasi, dan ovarium dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menghitung jumlah folikel.
3. Kelompok Perlakuan 1 (P1) : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr + CMCNa 0,5 % dalam 1 cc selama 14 hari kemudian dilakukan superovulasi, setelah itu dilakukan IVF untuk melihat kualitas oosit, setelah 20 jam dilakukan pengamatan angka fertilisasi, dan ovarium dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menghitung jumlah folikel.
4. Kelompok Perlakuan 2 (P2) : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr + CMCNa 5 % dalam 1 cc selama 14 hari kemudian dilakukan superovulasi, setelah itu dilakukan IVF untuk melihat kualitas oosit, setelah 20 jam dilakukan pengamatan angka fertilisasi, dan ovarium dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menghitung jumlah folikel.
5. Kelompok Perlakuan 3 (P3) : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr + CMCNa 5 % dalam 1 cc selama 14 hari kemudian dilakukan superovulasi, setelah itu dilakukan IVF untuk melihat kualitas oosit, setelah 20 jam dilakukan pengamatan angka fertilisasi, dan ovarium dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk menghitung jumlah folikel.

#### **4.4.2.1.5. Uji fertilitas mencit model endometriosis dengan melihat profil folikulogenesis, kualitas oosit, dan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro***

##### **4.4.2.1.5.1. Profil Folikulogenesis**

Pemeriksaan dilakukan dengan mengambil ovarium kanan dan kiri, selanjutnya kedua ovarium tersebut dibuat preparat histologi dan diamati jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf pada ovarium dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Setiap ovarium dibuat menjadi tiga preparat yaitu bagian anterior, bagian medial dan bagian sepertiga posterior. Pengamatan dan penilaian jumlah folikel dilihat pada semua lapangan pandang. Hasil perhitungan yang diperoleh adalah jumlah dari semua pengamatan kedua ovarium.

##### **4.4.2.1.5.2. Kualitas Oosit**

Pemeriksaan dilakukan dengan cara mengkoleksi oosit dari kantung fertilisasi (ampulla yang mengembang) kemudian dilakukan pemotretan terhadap oosit yang masih lengkap dengan *Cumulus Oophorus Complex* (COC) dengan menggunakan camera digital Canon Ixus 95 I dengan pembesaran mikroskop *inverted* 100x dan pembesaran camera 3,0x setelah itu luas keliling COC diukur dengan menggunakan *software Miotic Image II Plus*.

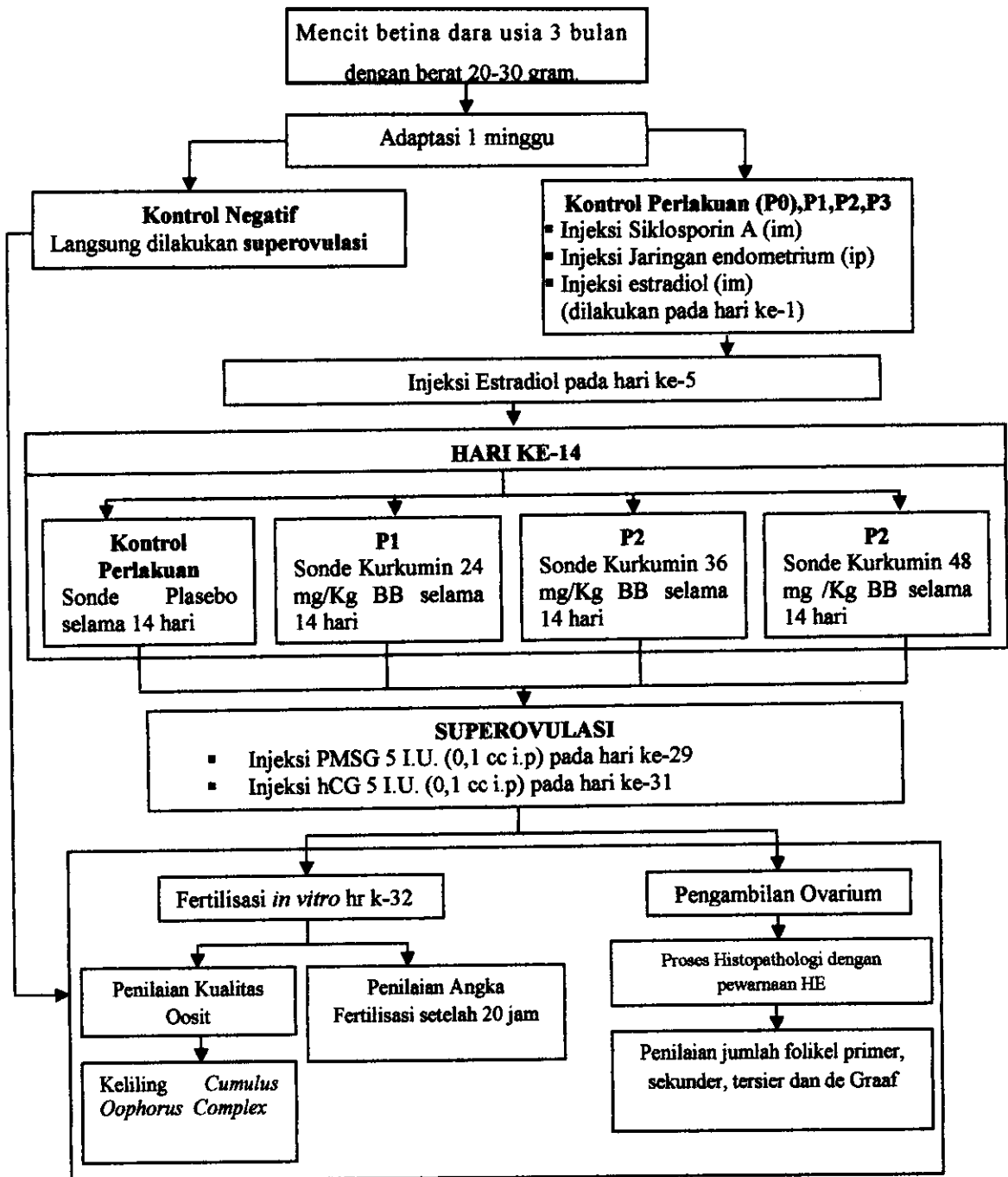
##### **4.4.2.1.5.3. Angka Fertilisasi**

Angka fertilisasi adalah jumlah sel telur mencit model endometriosis yang berhasil dibuahi oleh spermatozoa pada medium MEM pada proses fertilisasi *in vitro* setelah 20 jam di inkubasi dalam incubator CO<sub>2</sub>. Indikator terjadinya fertilisasi adalah adanya badan kutub kedua. Fertilisasi dilakukan secara *in vitro*

dengan cara mempertemukan ovum kelompok KN, P0, P1, P2 dan P3 yang telah didapatkan melalui ovum *pick up* yang telah termaturasi dengan spermatozoa yang berasal dari cauda epididimis dalam *incubator* CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5<sup>0</sup> C dengan menggunakan medium MEM sebagai medium fertilisasi *in vitro*. Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah banyaknya jumlah embrio satu sel dan dua sel, apabila tidak terjadi fertilisasi ditandai dengan masih terdapatnya oosit dan *cumulus oophorus* yang masih kompleks (Widjiati dkk., 2000).

#### 4.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima kelompok perlakuan dan enam kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analisis Sidik Ragam dengan *probability* sebesar 5% ( $p < 0,05$ ) dan penghitungan untuk angka fertilisasi perbedaan antar kelompok perlakuan diuji dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji Tukey apabila terdapat perbedaan pada perlakuan, perhitungan kualitas oosit perbedaan antar kelompok perlakuan diuji dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji Tukey apabila terdapat perbedaan pada perlakuan, sedangkan pada perhitungan profil folikulogenesis perbedaan antar kelompok perlakuan diuji dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji BNT atau LSD apabila terdapat perbedaan pada perlakuan (Santoso, 2001. Analisis statistika dilakukan dengan menggunakan SPSS (*Statistica Product and Service Solution*) XII for Windows.



Gambar 4. Kerangka Operasional Penelitian.

## BAB 5

# HASIL PENELITIAN



## BAB 5. HASIL PENELITIAN

Berdasarkan hasil penelitian dengan kontrol negatif (KN) adalah kelompok mencit tanpa perlakuan, kontrol perlakuan (P0) adalah kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0), kelompok perlakuan satu (P1) adalah kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari, kelompok perlakuan dua (P2) adalah kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari, dan kelompok perlakuan tiga (P3) adalah kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari terhadap fertilisasi yang dilihat berdasarkan profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi adalah sebagai berikut :

### 5.1. Profil Folikulogenesis

Penentuan hasil perkembangan folikulogenesis pada ovarium mencit dilakukan dengan serangkaian pengamatan mikroskopis untuk menghitung jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf. Pengamatan dan perhitungan jumlah folikel yang dikehendaki didasarkan pada ciri-ciri yang dimiliki oleh masing-masing folikel.

Data yang diperoleh dari serangkaian pengamatan mikroskop masing-masing dianalisis dengan menggunakan *One Way Analysis of Variant* (ANOVA) dengan nilai probabilitas ( $p < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan dengan uji *Low Significant Differential* (LSD) atau Beda Nyata Terkecil.

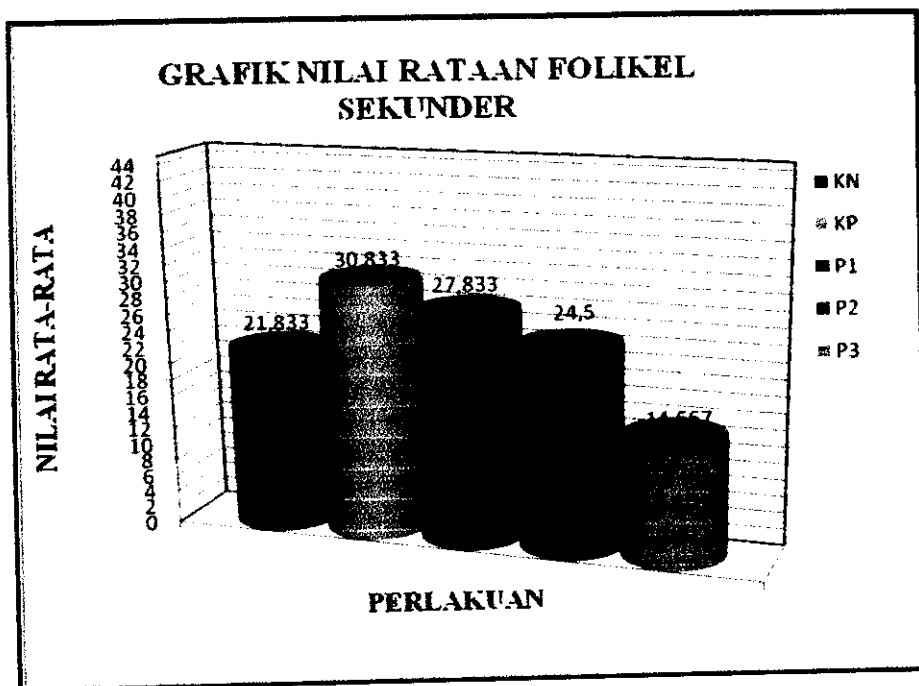
**Tabel 5.2. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Folikel Sekunder**

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	21,833 <sup>ab</sup> ± 4,445
P0	6	30,833 <sup>a</sup> ± 8,010
P1	6	27,833 <sup>a</sup> ± 2,639
P2	6	24,500 <sup>ab</sup> ± 7,204
P3	6	14,667 <sup>b</sup> ± 5,465

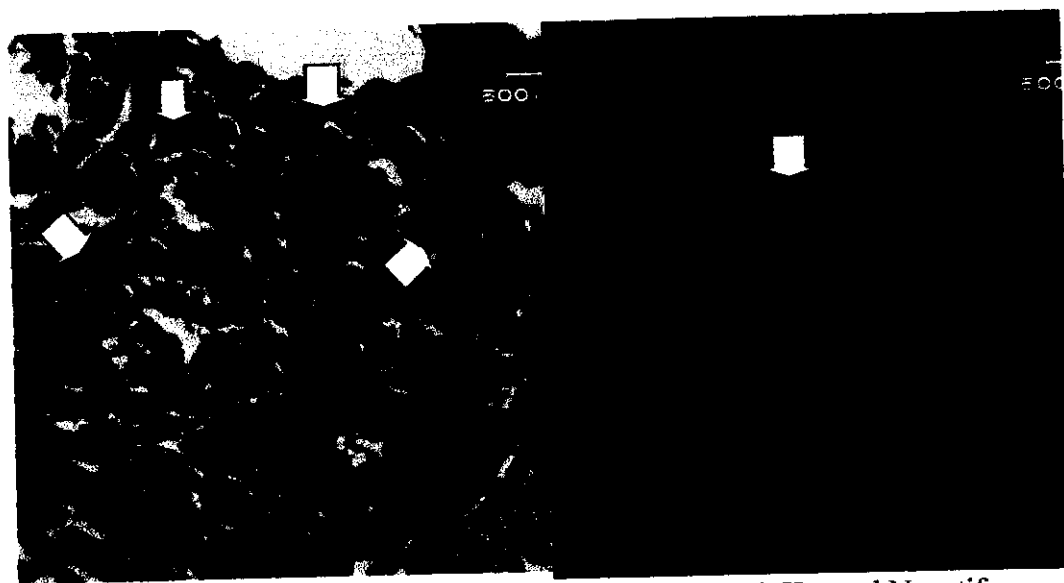
Keterangan :

- a,ab,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji LSD.
- KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.
- P0 : Mencit penderita endometriosis ektopik dengan *placebo*.
- P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.
- P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.
- P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Nilai rataan yang tinggi pada P0 dan P1 dikarenakan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik mengalami perpanjangan masa folikuler dikarenakan terjadinya apoptosis sel granulosa. Diagram nilai rataan folikel sekunder dan gambar bentuk folikel sekunder pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.3. dan Gambar 5.4. dibawah ini :

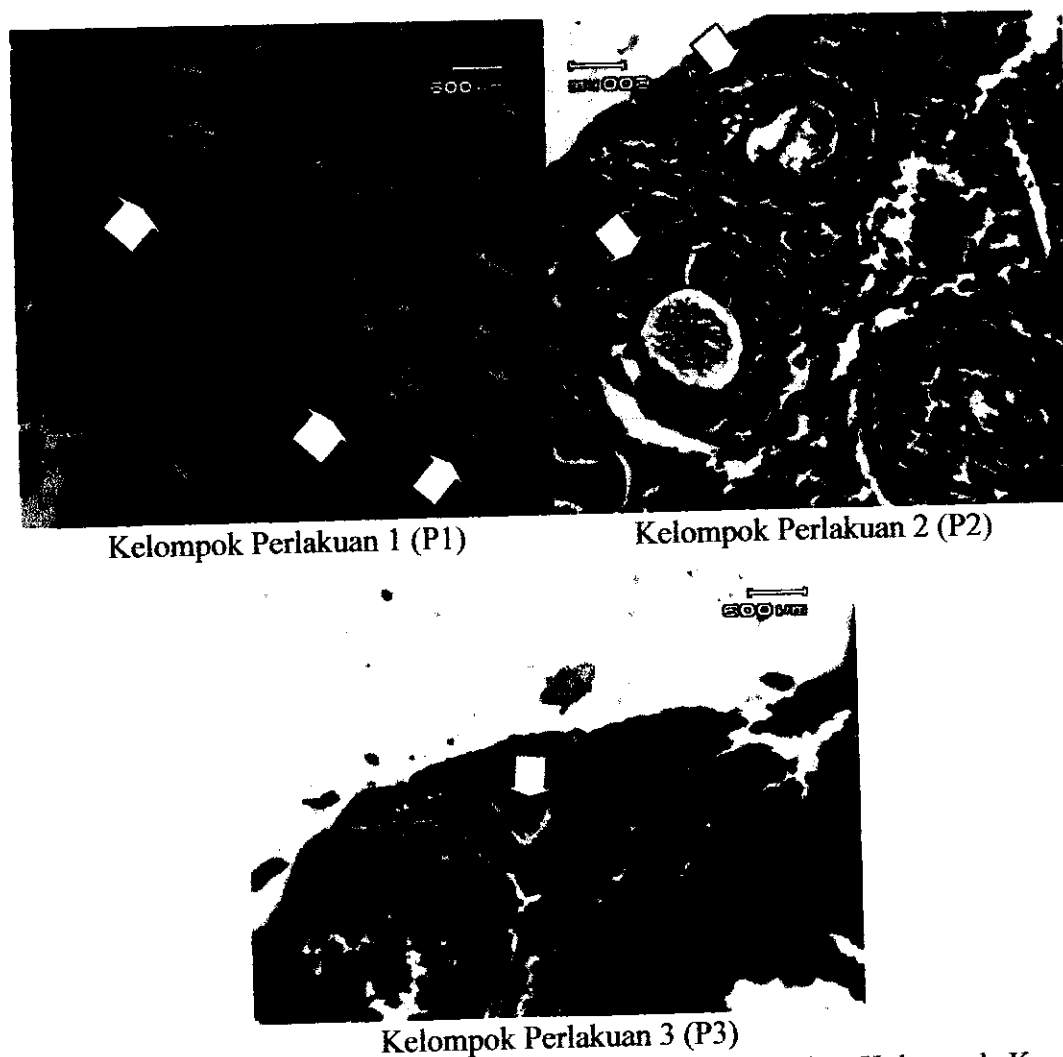


Gambar 5.3. Grafik Nilai Rataan Folikel Sekunder



Kelompok Kontrol Perlakuan

Kelompok Kontrol Negatif



Gambar 5.4. Bentuk Folikel Sekunder Pada Masing-Masing Kelompok Kontrol Dan Perlakuan. Pengamatan dilakukan pada pembesaran mikroskop 400x. Tanda (◻) menunjukkan bentuk folikel Sekunder.

### 5.1.3. Folikel Tersier

Hasil perhitungan jumlah folikel tersier pada kelompok kontrol dan perlakuan yang diuji dengan menggunakan *One Way ANOVA* yang apabila terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan ( $p < 0,05$ ) kemudian dilanjutkan dengan uji LSD. Hasil pengamatan berupa nilai rata-rata dan simpangan baku pada folikel tersier dapat dilihat pada Tabel. 5.2.(Lampiran 3) dibawah ini :

**Tabel 5.3. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Folikel Tersier**

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	53,167 <sup>a</sup> ± 4,535
P0	6	35,333 <sup>c</sup> ± 2,943
P1	6	36,667 <sup>bc</sup> ± 4,718
P2	6	45,000 <sup>abc</sup> ± 8,000
P3	6	45,833 <sup>ab</sup> ± 8,256

Keterangan :

a,ab,abc,c : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji LSD.

KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.

P0 : Mencit penderita endometriosis ektopik dengan *placebo*.

P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.

P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.

P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik diatas dapat dilihat terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) antara KN dengan P0 dan P1, namun KN dengan P2 dan P3 terdapat perbedaan yang nyata. Sedangkan, antara P0 dan P1, juga P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Antara P2 dan P3 terdapat perbedaan yang nyata dengan KN, P0 dan P1. Adapun grafik nilai rataan folikel tersier dan gambar bentuk folikel tersier dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan Gambar 5.6.



Perlakuan 3 (P3)

Gambar 5.6. Bentuk Folikel Tersier Pada Masing-Masing Kelompok Kontrol Dan Perlakuan. Pengamatan dilakukan pada pembesaran mikroskop 400x. Tanda (□) menunjukkan bentuk folikel Tersier.

#### 5.1.4. Folikel de Graaf

Hasil pengamatan folikel de Graaf pada kelompok kontrol dan perlakuan dianalisis dengan uji *One Way* ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan probabilitas ( $p < 0,05$ ). Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan adanya peningkatan keliling kumulus ooporus pada P3 dan P2, hal ini menunjukkan bahwa pemberian *curcumin* efektif untuk meningkatkan kualitas oosit yaitu keliling kumulus ooporus, dibandingkan KN dan P1. Pada P0 menunjukkan nilai rata-rata yang paling rendah dikarenakan pada P0 terjadi perpanjangan masa folikuler. Analisis statistika nilai rata-rata dan simpangan baku dengan menggunakan ANOVA terhadap folikel de Graaf pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.4. (Lampiran 3).

**Tabel 5.4. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Folikel de Graaf**

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	12,000 <sup>ab</sup> ± 10,488
P0	6	2,833 <sup>b</sup> ± 4,915
P1	6	17,667 <sup>a</sup> ± 2,250
P2	6	22,833 <sup>a</sup> ± 8,953
P3	6	24,000 <sup>a</sup> ± 6,131

Keterangan :

a,ab,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji LSD.

KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.

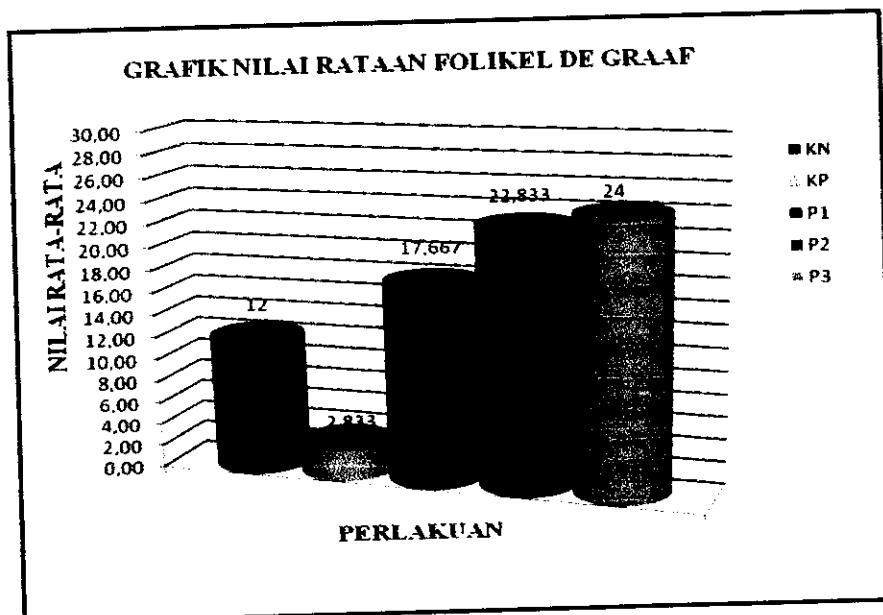
P0 : Mencit penderita endometriosis ektopik dengan *placebo*.

P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.

P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.

P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Hasil pengamatan berupa diagram nilai rataan folikel de Graaf dan gambar bentuk folikel de Graaf dapat dilihat pada Gambar 5.7. dan Gambar 5.8. dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



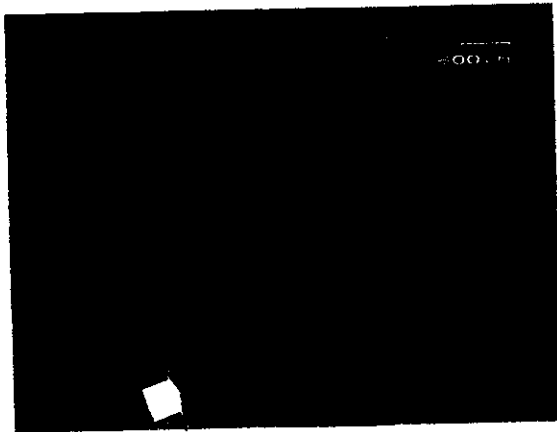
Gambar 5.7. Grafik Nilai Rataan Folike de Graaf



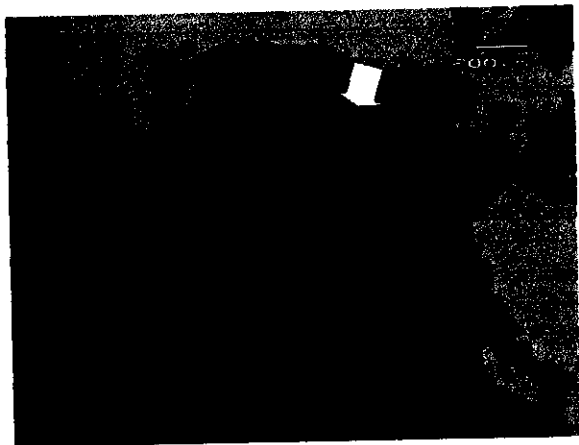
(a). Kelompok Kontrol Perlakuan



(b). Kelompok Kontrol Negatif



(c). Kelompok Perlakuan 1 (P1)



(d). Kelompok Perlakuan 2 (P2)



(e). Kelompok Perlakuan 3 (P3)

Gambar 5.8. Bentuk Folikel de Graaf Pada Masing-Masing Kelompok Kontrol Dan Perlakuan. (a). Bentuk folikel de Graaf dengan pembesaran 400x dan pembesaran kamera 3x, (b). Bentuk folikel de Graaf dengan pembesaran 400x, (c). Bentuk folikel de Graaf dengan pembesaran 200x, (d). Bentuk folikel de Graaf dengan pembesaran 400x, (e). Bentuk folikel de Graaf dengan pembesaran 200x. Tanda (→) menunjukkan bentuk folikel de Graaf.



## 5.2. Kualitas Oosit

Penentuan kualitas oosit dilakukan dengan cara mengamati oosit secara mikroskopis untuk melihat keliling kumulus ooporus. Pengamatan dan pengukuran keliling kumulus ooporus dengan menggunakan *software Motic Image Plus 2.0*. Diagram nilai keliling kumulus ooporus pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.9. Sedangkan, jumlah oosit, nilai rata-rata dan simpangan baku pada kualitas oosit yang terdiri dari keliling kumulus dapat dilihat pada Tabel 5.5. (Lampiran 3) dibawah ini.

**Tabel 5.5. Jumlah Oosit, Nilai Rataan dan Simpangan Baku Pada Kualitas Oosit**

Perlakuan	N	Jumlah Oosit	Pengamatan Kualitas Oosit Rataan Keliling Kumulus Ooporus (cm)	Simpangan Baku Keliling Kumulus Ooporus
KN	6	134	2,98 <sup>b</sup>	0,239
P0	6	0	0 <sup>a</sup>	0
P1	6	94	3,07 <sup>b</sup>	0,125
P2	6	124	3,60 <sup>a</sup>	0,256
P3	6	163	3,80 <sup>a</sup>	0,318

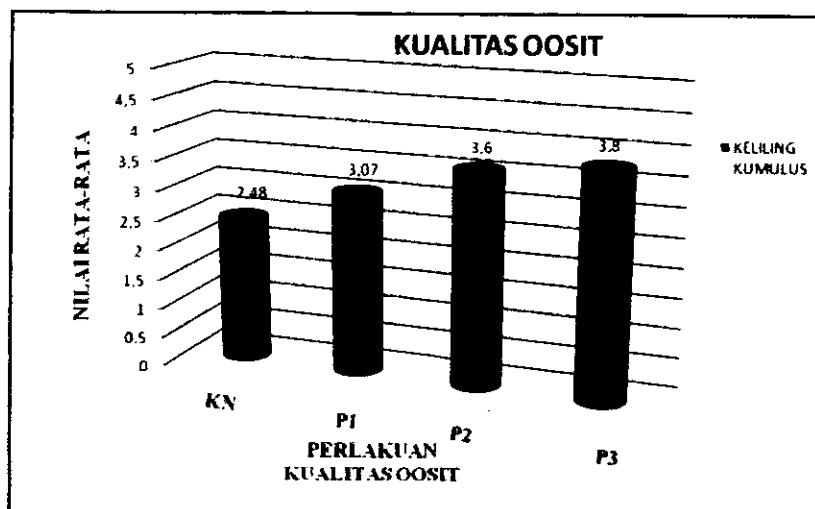
Keterangan :

- a,b,c : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji Tukey's HSD.
- KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.
- P0 : Mencit penderita endometriosis ektopik dengan *placebo*.
- P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.
- P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.
- P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Pada kelompok kontrol perlakuan tidak didapatkan oosit dari proses *ovum pick up* dikarenakan pada kontrol perlakuan tidak didapatkan adanya kantong fertilisasi dan dimungkinkan terjadinya infertilitas. Data yang diperoleh dari

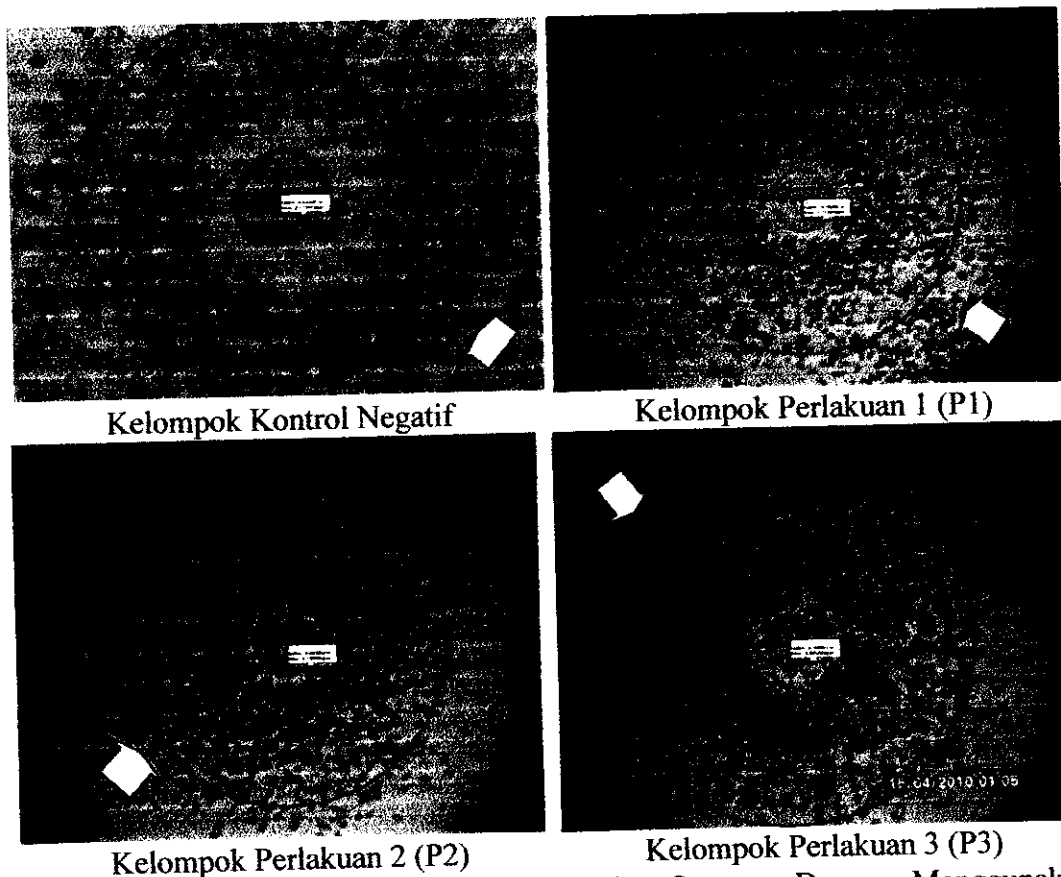
serangkaian pengamatan dan pengukuran dianalisis dengan menggunakan *One Way ANOVA* (Lampiran 3) dan apabila terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok kontrol dan perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*High Significant Different*) dengan probability ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan hasil perhitungan keliling kumulus ooporus antara kelompok kontrol dan perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ). KN sangat berbeda nyata dengan P3, P1 sangat berbeda nyata dengan P3, dan P3 juga sangat berbeda nyata dengan KN dan P1. Sedangkan, KN berbeda nyata dengan P2, dan P2 juga berbeda nyata dengan P1, dan KN tidak berbeda nyata dengan P1, juga P2 dan P3 tidak berbeda nyata dengan P3. Hasil analisis statistik diatas menunjukkan adanya peningkatan keliling kumulus ooporus pada P3 dan P2, hal ini menunjukkan bahwa pemberian kurkumin efektif untuk meningkatkan kualitas oosit yaitu keliling kumulus ooporus, dibandingkan KN dan P1. Adapun diagram nilai rata-rata keliling kumulus ooporus pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.9. Grafik nilai rata-rata kualitas oosit.



Gambar 5.9. Grafik nilai rata-rata kualitas oosit.

Gambar pengamatan keliling kumulus ooporus dapat dilihat pada Gambar 5.10. dan Gambar 5.11. dibawah ini.

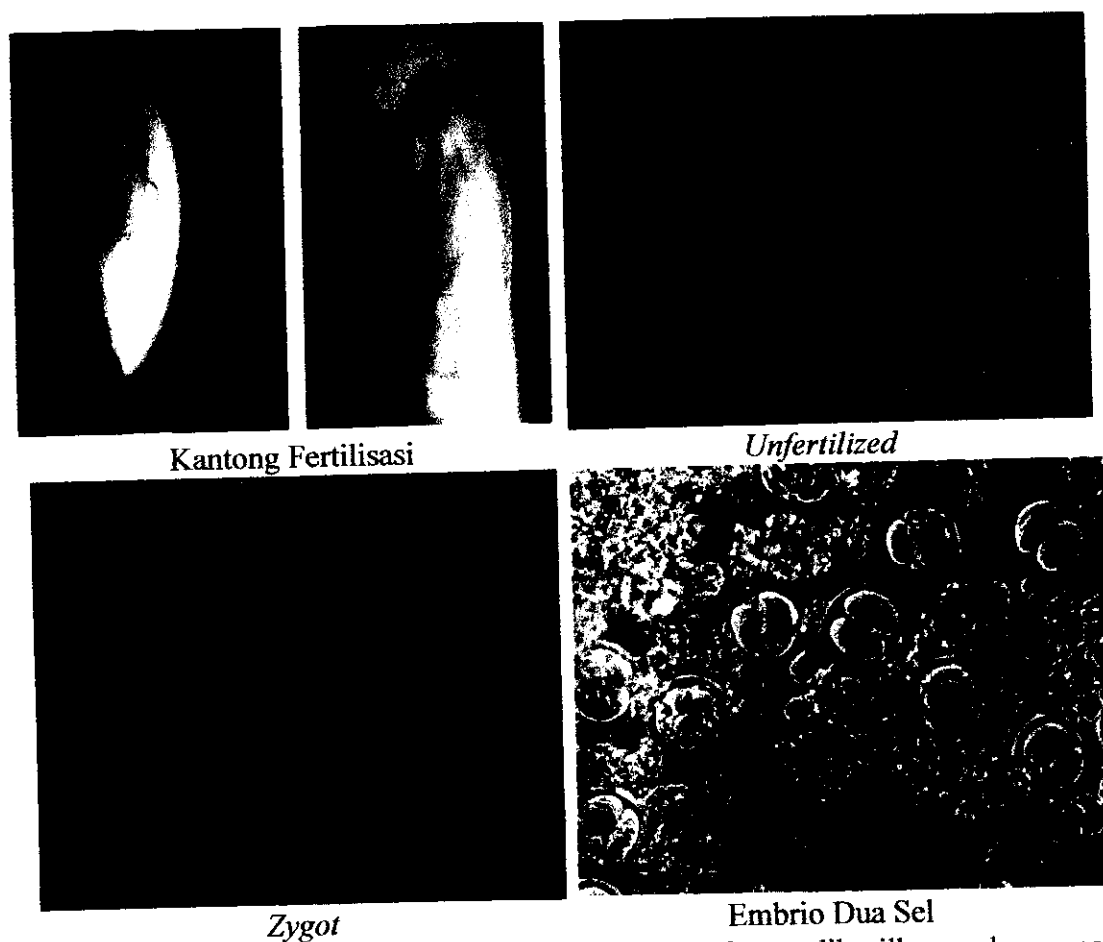


Gambar 5.10. Pengukuran Keliling Kumulus Ooporus Dengan Menggunakan *Motic Image Plus 2.0* Pada Masing-Masing Kelompok Kontrol Dan Perlakuan. Pengamatan dilakukan pada pembesaran mikroskop 100x. Tanda (□) menunjukkan bentuk keliling kumulus ooporus.

### 5.3. Angka Fertilisasi

Salah satu penentuan fertilitas adalah dengan melihat angka fertilisasi yang terjadi dilakukan dengan cara mengamati jumlah ovum yang berhasil dan tidak berhasil difertilisasi oleh spermatozoa pada proses fertilisasi *in vitro* selama 20-24 jam masa inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C. Embrio dua sel, zygot dan *unfertilized* yang dihasilkan pada proses fertilisasi *in vitro* pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol selama 20-24 jam masa inkubasi

dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C serta gambar kantong fertilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.12. dibawah ini.



Gambar 5.12. Embrio dua sel, zygot dan *unfertilized* yang dihasilkan pada proses fertilisasi *in vitro* pada masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol selama 20-24 jam masa inkubasi.

Data yang diperoleh dari serangkaian pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis *One Way ANOVA* dengan probabilitas ( $p < 0,05$ ) bila terdapat perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan dan control maka dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*High Significant Different*). Jumlah oosit, jumlah embrio, dan presentase angka fertilisasi yang terjadi selama 20-24 jam masa inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C pada proses fertilisasi *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 5.8 (Lampiran 3) dibawah ini.

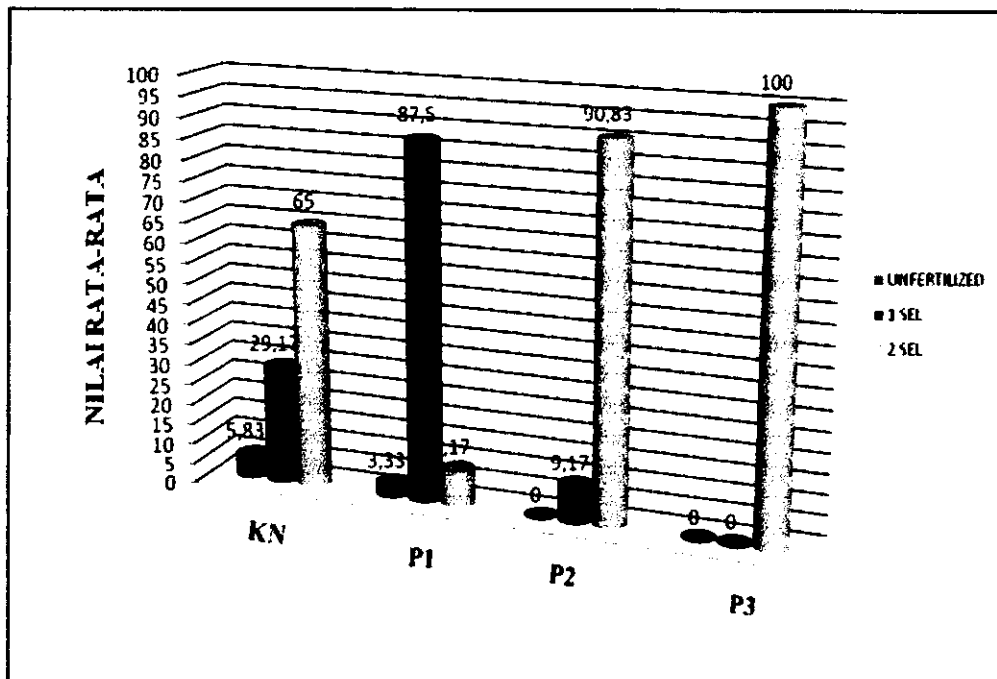
**Tabel 5.6. Jumlah oosit, jumlah embrio, dan presentase angka fertilisasi yang terjadi selama 20-24 jam masa inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C pada prose fertilisasi *in vitro*.**

Perlakuan	N	Jumlah Oosit	Pengamatan Angka Fertilisasi (%)			Kantong Fertilisasi (%)
			<i>Unfertilized</i>	Zygot	Dua Sel	
KN	6	134	2 (1,49)	87 (66,42)	45 (33,58)	87 (+)
P0	6	0	0	0	0	100 (-)
P1	6	94	0	49 (52,13)	45 (47,87)	60 (+)
P2	6	124	0	12 (10)	112 (90)	50 (+)
P3	6	163	0	163(100)	163 (100)	100 (+)

Keterangan :

- KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.
- P0 : Mencit penderita endometriosis ektopik dengan *placebo*.
- P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.
- P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.
- P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Gambar grafik nilai rata-rata angka fertilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.13. dibawah ini.



Gambar 5.13. Grafik nilai rata-rata angka fertilisasi.

### 5.3.1. *Unfertilized*

Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan pada ovum yang tidak terfertilisasi (*unfertilized*) antara kelompok kontrol dan perlakuan tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ). Nilai rata-rata dan simpangan baku pada ovum yang tidak terfertilisasi (*unfertilized*) dapat dilihat pada Tabel 5.8. (Lampiran 3) dibawah ini.

**Tabel 5.7. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Ovum yang *Unfertilized***

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	$5,83^a \pm 10,20$
P1	6	$3,33^a \pm 6,05$
P2	6	$0^a \pm 0$
P3	6	$0^a \pm 0$

Keterangan :

- a, b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji Tukey's HSD.
- KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.
- P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.
- P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.
- P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

### 5.3.2. *Zygot (Embrio satu sel)*

Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan jumlah zygot atau embrio satu sel antara kelompok kontrol dan perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ). KN ( $65,000 \pm 36,878$ ) dan P1 ( $87,500 \pm 20,916$ ) sangat berbeda nyata dengan P2 ( $9,167 \pm 11,143$ ) dan P3 ( $0 \pm 0$ ) ( $p < 0,05$ ), sedangkan antara KN dengan P1 tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ), begitu juga antara P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Nilai rata-rata dan simpangan

baku pada embrio satu sel atau zygot dapat dilihat pada Tabel 5.9. (Lampiran 3) dibawah ini.

**Tabel 5.8. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Zygot (Embrio satu sel)**

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	65,000 <sup>b</sup> ± 36,878
P1	6	87,500 <sup>b</sup> ± 20,916
P2	6	9,167 <sup>a</sup> ± 11,143
P3	6	100 <sup>a</sup> ± 0

Keterangan :

a, b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji Tukey's HSD.

KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.

P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.

P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.

P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa pemberian *curcumin* sangat berpengaruh terhadap fertilitas. Hal ini terbukti dengan sangat efektifnya pemberian *curcumin* pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dibandingkan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) terhadap peningkatan angka fertilisasi pada tahap satu sel atau zygot.

### 5.3.3. Embrio Dua Sel

Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan jumlah embrio dua sel antara kelompok kontrol dan perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ). KN ( $29,167 \pm 31,371$ ) dan P1 ( $9,167 \pm 14,972$ ) sangat berbeda nyata dengan P2 ( $90,833 \pm 11,143$ ) dan P3 ( $100 \pm 0$ ) ( $P < 0,05$ ), sedangkan antara KN dengan P1 tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ), begitu juga antara P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Nilai rata-rata dan simpangan baku pada embrio satu sel atau zygot dapat dilihat pada Tabel 5.10. (Lampiran 3) dibawah ini.

**Tabel 5.9. Hasil Rataan dan Simpangan Baku Pada Perhitungan Jumlah Embrio Dua Sel**

Perlakuan	N	Nilai Rataan dan Simpangan Baku
KN	6	$29,167^b \pm 31,371$
P1	6	$9,167^b \pm 14,972$
P2	6	$90,833^a \pm 11,143$
P3	6	$100^a \pm 0$

Keterangan :

- a,b : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan terdapatnya perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan uji Tukey's HSD.
- KN : Mencit sehat tanpa perlakuan.
- P1 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hr.
- P2 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hr.
- P3 : Mencit penderita endometriosis ektopik diberikan sonde *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hr.

Berdasarkan hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa pemberian *curcumin* sangat berpengaruh terhadap fertilitas. Hal ini terbukti dengan sangat efektifnya pemberian *curcumin* pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok



mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dibandingkan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) terhadap peningkatan angka fertilsasi pada tahap dua sel.

# BAB 6

## PEMBAHASAN

## BAB 6. PEMBAHASAN

### 6.1. Folikulogenesis

Salah satu cara untuk mengetahui aktivitas pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik terhadap fertilitas adalah dengan melihat profil folikulogenesis melalui pengamatan jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf. Perhitungan jumlah folikel ini dimaksudkan untuk mengetahui aktifitas pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik. Menurut Liben (2003), folikulogenesis merupakan suatu proses perkembangan folikel. Dalam masa kehidupan fetus terdapat siklus pembentukan folikel, pemasakan dan atresia. Jumlah folikel pada masa fetus sebanyak enam juta folikel. Pada saat lahir folikel berjumlah dua juta folikel. Pada masa pubertas folikel berjumlah 300.000-400.000 folikel dan yang dimaturasi sebanyak 400 folikel. Dari 400 folikel ini, akan dilepaskan satu folikel pada tiap ovulasi.

Menurut Harjopronyoto (1995), banyak faktor yang dapat mempengaruhi jumlah folikel yang berkembang dalam satu siklus birahi seperti species hewan, fase reproduksi, keadaan lingkungan, umur induk dan genetik. Folikel mencapai kematangannya melalui tingkatan-tingkatan perkembangan folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier dan folikel de Graaf. Folikulogenesis dimulai dari diambilnya folikel primer ke dalam suatu kumpulan yang berisi folikel-folikel yang sedang tumbuh berkembang dan diakhiri dengan baik dengan ovulasi atau mati menjadi folikel atresia. Pengamatan dan perhitungan terhadap jumlah folikel

yang dikehendaki dihitung berdasarkan pada cirri-ciri yang dimiliki oleh masing-masing folikel.

Folikel primer terdiri dari oosit primer yang dikelilingi oleh selapis pipih yang disebut sel folikuler, berkumpul dibawah tunika albugenia dan sel telurnya tidak terbungkus oleh membrane viteline. Folikel primer ini dibentuk pada saat hewan betina masih dalam kandungan dan setelah lahir (Partodihardjo, 1992). Menurut Toelihere (1981) dan Guyton (1996), folikel primer tidak dibentuk dalam kehidupan dewasa. Sesudah masa pubertas FSH dan LH dari kelenjar hipofise anterior mulai disekresikan dalam jumlah besar sehingga ovarium bersama folikelnya mulai tumbuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik berpengaruh sangat nyata terhadap profil folikulogenesis.

Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) jumlah folikel primer menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Pada perhitungan folikel primer ini menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) mempunyai nilai rataan jumlah folikel primer paling tinggi yaitu sebesar  $19,16 \pm 4,21$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan nilai rataan jumlah folikel primer sebesar  $18,16 \pm 6,36$ , kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan nilai rataan jumlah folikel primer sebesar  $17 \pm 5,83$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) sebesar  $16,33 \pm 6,50$ , dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik

yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) sebesar  $11,33 \pm 9,54$ . Hal ini disebabkan karena pembentukan folikel primer tidak dipengaruhi oleh FSH dan LH, pertumbuhan dan perkembangan folikel juga tidak dipengaruhi oleh stimulasi hormone gonadotropin (Guyton, 1996).

Folikel sekunder, merupakan perkembangan lanjut dari folikel primer. Bentuk folikel sekunder lebih besar, karena sel-sel granulosanya lebih banyak dan mengitari oosit yang ditandai dengan adanya zona pelusida yang mengitari membrane oosit. Folikel ini biasanya terletak agak jauh dari permukaan ovarium. Pada stadium ini terjadi pertumbuhan folikel dan pertumbuhan ini sangat dipengaruhi oleh hormon gonadotropin (Partodihardjo, 1992; Ismudiono, 1999).

Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) jumlah folikel sekunder menunjukkan perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Pada perhitungan folikel sekunder ini menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) mempunyai nilai rata-rata jumlah folikel primer paling tinggi yaitu sebesar  $30,83 \pm 8,01$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan nilai rata-rata jumlah folikel primer sebesar  $27,833 \pm 2,63$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) sebesar  $24,50 \pm 7,20$ , kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan nilai rata-rata jumlah folikel primer sebesar  $21,83 \pm 4,44$ , dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) sebesar  $14,67 \pm 5,46$ .

Hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) sangat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3), sedangkan antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) terdapat perbedaan yang nyata.

Folikel tersier ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulosa, sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan ovarium. Perkembangan selanjutnya folikel akan membentuk suatu ruangan yang disebut antrum dan berisi cairan yang disebut cairan folikuler atau liquor folikuli, pertumbuhan folikel ini dipengaruhi oleh hormone gonadotropin (Partodihardjo, 1992).

Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) jumlah folikel tersier menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Pada perhitungan folikel tersier ini menunjukkan bahwa kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) mempunyai nilai rata-rata jumlah folikel tersier paling tinggi yaitu sebesar  $53,16 \pm 4,53$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg

BB/hari (P3) dengan nilai rata-rata jumlah folikel tersier sebesar  $45,83 \pm 8,25$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dengan nilai rata-rata jumlah folikel tersier sebesar  $45 \pm 8$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan nilai rata-rata jumlah folikel tersier sebesar  $36,67 \pm 4,71$ , dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan nilai rata-rata jumlah folikel tersier sebesar  $35,33 \pm 2,94$ .

Hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan bahwa kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) sangat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), dan antara kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3), antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ), sedangkan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ),

antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN), kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), dan antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ).

Folikel de Graaf adalah folikel bentuk terakhir dan terbesar pada ovarium dan hanya terjadi beberapa hari menjelang estrus. Pada folikel de Graaf ovum terbungkus dengan massa sel yang disebut *cumulus oophorus*. Ovum bersama massa sel yang menonjol kedalam ruang antrum yang penuh dengan cairan folikuler (Partodihardjo, 1992).

Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) jumlah folikel de Graaf menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Pada perhitungan folikel de Graaf ini menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai nilai rata-ran jumlah folikel tersier paling tinggi yaitu sebesar  $24 \pm 6,13$ , kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dengan nilai rata-ran jumlah folikel de Graaf sebesar  $22,83 \pm 8,95$ , kelompok



mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan nilai rata-ran jumlah folikel de Graaf sebesar  $17,67 \pm 2,25$ , kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan nilai rata-ran jumlah folikel de Graaf sebesar  $12 \pm 10,48$ , dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan nilai rata-ran jumlah folikel de Graaf sebesar  $2,83 \pm 4,91$ .

Hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) tidak berbeda nyata dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3), kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) sangat berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0), sedangkan antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) dan antara kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ). Namun, antara kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan

kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0), kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2), dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ).

Folikulogenesis merupakan suatu proses tumbuh dan maturasi sel germinal pada hewan betina di dalam lingkungan sel somatic ovarium untuk menjadi oosit matur yang siap untuk di fertilisasi. Folikel ovarium adalah unit fungsional reproduksi betina yang terdiri dari oosit, sel granulosa dan sel teka. Folikulogenesis melibatkan kerja sama erat antara ketiga sel diatas dan mencakup banyak proses antara lain proliferasi sel granulosa, meiosis oosit, steroidogenesis sel teka, ekspansi kumulus (Knaight *et al.*, 2006). Kegiatan fisiologi ovarium, sangat bergantung kepada aktifitas kelenjar hipofisa anterior. Hormon dari kelenjar hipofisa anterior dan *growth factor* memegang peranan yang penting dalam mengatur aktifitas ovarium. Pada awal siklus kadar estradiol dan progesterone rendah hal ini merangsang hipofisa untuk memproduksi sekresi *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH) (Hardjopranoto, 1995).

Kenaikan gonadotropin ini terutama FSH bersama GDF-9 diperlukan untuk merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium yang akhirnya menghasilkan estrogen. Estrogen ini akan menghambat sekresi FSH lewat jalur *feedback negative* sehingga semua folikel akan mengalami atresia, kecuali beberapa folikel yang sudah menghasilkan estrogen. Folikel ini akan berkembang terus samapai pada tahap ovulasi. Gangguan pelepasan FSH bersama GDF-9

menyebabkan kegagalan pematangan folikel, sehingga jumlah folikel yang tumbuh lebih sedikit karena banyak folikel yang atresi. Folikel yang atresia ini dapat terjadi pada sembarang tahap perkembangan folikel. Folikel atresia ditandai dengan terhentinya proses meiosis dalam sel granulosa, terlepasnya sel granulosa dari laminal basal dan oosit mati (Liben, 2003).

*Folicle Stimulating Hormone* (FSH) pada sel granulosa memiliki peranan yang sangat penting dalam terjadinya mekanisme seleksi dan perkembangan folikel yang dominan, dan tidak ada ikatan lain yang dapat mempengaruhi aktivitasnya. Mekanisme utama dari kontrol FSH adalah dengan merangsang jalur transduksi reseptor FSH pada sel-sel granulosa. Meskipun LH tidak terlalu memegang peranan penting pada proses ini, tapi LH sangat berguna dalam mengatur formasi folikel dominan sampai akhirnya folikel dominan mempunyai kapasitas merangsang ekspresi dari substrat aromatase dan androstenedion. Untuk memahami perkembangan folikel dominan selama siklus, maka harus dipahami terlebih dahulu mengenai kerja dari FSH dan LH pada sel-sel granulosa dan sel interstitial theca (Anwar, 2005).

*Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dihasilkan oleh kelenjar hipofisis anterior pada pertengahan siklus reproduktif. Pada sel-sel granulosa, FSH berfungsi meningkatkan aktivitas enzimatis yang berguna mengkatalisa aromatisasi androgen atau sejenisnya untuk menghasilkan estrogen. Aktivitas ini diduga diatur dengan adanya peningkatan kerja adenilatsiklase dan androgen. Estrogen (estradiol) yang disintesa oleh folikel dominan berperan juga meningkatkan kerja sel folikuler FSH guna meningkatkan respon LH. Selain

menghasilkan estrogen, FSH berperan juga dalam pematangan telur khususnya pada tahap-tahap perubahan folikel (Anwar, 2005).

Pada sel teka, LH berperan untuk meningkatkan aktivitas enzim pembelah rantai kolesterol (yang diduga merupakan tahap penghambatan kecepatan steroidogenesis pada berbagai jaringan penghasil steroid) dan untuk meningkatkan aktivitas 17 alfa hidroksilase yang merupakan suatu enzim untuk pembentukan steroid androgen seperti dehidroisoandrosteron, 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 menjadi estradiol, dengan jumlah estradiol yang tinggi hal ini akan memberikan *feedback positive* pada LH sehingga terjadi LH surge yang akan menyebabkan terjadinya ovulasi.

*Growth Different Factor-9* (GDF-9) termasuk *growth factor* yang tergolong dalam super family TGF $\beta$ , yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, steroidogenesis sel teka, meiotic competence oosit, dan pertumbuhan folikel, selain itu GDF-9 juga berperan dalam pertumbuhan folikel de Graaf dan menginduksi ekspansi kumulus saat ovulasi. Dan proses ekspansi kumulus ini melibatkan asam hyalorant, asam hyaluronat merupakan komponen dominan pada matriks ekstraseluler yang berguna untuk mempersiapkan dan melindungi oosit terhadap enzim proteolitik dan stres mekanik saat ovulasi. Dengan demikian selain FSH dan LH, GDF-9 dan hyaluronant merupakan faktor yang sangat penting untuk proses folikulogenesis agar berjalan normal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *placebo* (P0) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) mempunyai nilai rata-ran jumlah folikel primer dan sekunder yang paling tinggi paling tinggi diantara kelompok kontrol dan perlakuan lainnya., hal ini dapat disebabkan oleh adanya perpanjangan masa folikuler akibat dari terjadinya apoptosis sel granulosa hal ini menyebabkan terjadi gangguan pertumbuhan oosit yang ditandai dengan gangguan pertumbuhan folikel, proliferasi dan diferensiasi oosit. Secara tidak langsung hal ini berakibat pada terjadinya penurunan kadar FSH dan GDF-9. Keadaan ini menyebabkan terjadinya hambatan mekanisme pengekspresian reseptor FSH Aktivin dan GDF-9 yang diproduksi oleh sel granulosa yang diduga memiliki peranan dalam merangsang ekspresi reseptor FSH melalui mekanisme autokrin/parakrin.

Penurunan kadar FSH dan GDF-9 pada sel granuloase akibat terjadinya apoptosis yang berlebihan pada sel granulosa ini menyebabkan aktivitas enzimatik yang berguna untuk mengkatalisa aromatisasi androgen untuk menghasilkan estrogen terganggu, sehingga hal ini menyebabkan terjadinya hambatan proses steroidogenesis dan penurunan sensitifitas estrogen untuk memberi umpan balik ke hipofisa anterior agar GnRH memproduksi LH. Akibatnya hal ini akan mempengaruhi proses maturasi oosit sehingga terjadi perpanjangan masa folikular yang mengakibatkan terjadinya gangguan folikulogenesis pada kelompok kontrol positif, sedangkan pada kelompok perlakuan 1 (P1) hal ini dapat disebabkan karena pemberian dosis *curcumin* pada kelompok ini kurang efektif.

*Curcumin* merupakan salah satu pengobatan herbal yang mampu menekan jalur NF- $\kappa$ B dan gen NF- $\kappa$ B *target cytokines* pada penderita endometriosis, Wieser *et al.*, (2007) mendemonstrasikan efek *curcumin* pada sel stroma endometriosis, *curcumin* menghambat induksi sitokin *pro-inflammatory*, sitokin angiogenik dan *macrophag migration inhibitory factor* oleh NF- $\kappa$ B pada model *in vitro*. Beberapa penelitian terbaru juga menyebutkan efek modulasi *curcumin* terhadap beberapa target molekul penting (TNF, IL-1, IL-6) dan enzim (COX-2), (Wieser *et al.*, 2007). Selain itu *curcumin* juga dapat menurunkan ekspresi gen anti apoptosis, efek anti oksidan dan efek anti angiogenesis (Sharma *et al.*, 2005; Joe *et al.*, 2008).

Pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3), kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) mempunyai nilai rata-rata jumlah folikel tersier dan folikel de Graaf paling tinggi diantara kelompok kontrol dan perlakuan lainnya. Hal ini membuktikan bahwa dengan diberikannya *curcumin* pada dosis 48 dan 36 mg/Kg BB/hari efektif untuk mengatasi masalah endometriosis ektopik terhadap peningkatan profil folikulogenesis. Peningkatan profil folikulogenesis pada P3, P2 dan KN hal ini dikarenakan *curcumin* berhasil melakukan penghambatan sekresi TNF- $\alpha$  dan sitokin *pro-inflammatory* yang berlebihan lewat jalur penekanan NF- $\kappa$ B. Penghambatan sekresi TNF- $\alpha$  dan sitokin *pro-inflammatory* yang berlebihan melalui penekanan jalur NF- $\kappa$ B dan gen NF- $\kappa$ B *target cytokines* oleh *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik melalui mekanisme modulasi

beberapa target molekul *pro-inflammatory* pada mencit penderita endometriosis ektopik terutama target molekul TNF- $\alpha$ , enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *xanthine oxidase* yang dapat menurunkan terjadinya apoptosis sel granulosa yang secara langsung dapat meningkatkan peningkatan dari kadar FSH bersama GDF-9 yang akan meningkatkan perkembangan folikel.

Peningkatan kadar FSH pada sel-sel granulosa, akan meningkatkan aktivitas enzimatik yang berguna untuk mengkatalisa aromatisasi androgen atau sejenisnya untuk menghasilkan estrogen. Aktivitas ini diduga diatur dengan adanya peningkatan kerja adenilatsiklase dan androgen. Estrogen (estradiol) yang disintesa oleh folikel dominan berperan juga meningkatkan kerja sel folikuler FSH guna meningkatkan respon LH. Selain menghasilkan estrogen, FSH berperan juga dalam pematangan telur khususnya pada tahap-tahap perubahan folikel. Selain itu kadar GDF-9 pada sel granulosa akan mengalami peningkatan sehingga GDF-9 mampu menjalankan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa dengan baik sehingga proliferasi sel teka tidak akan terganggu. Pada sel teka interstitial ini memiliki reseptor sel untuk LH dan insulin, sebagai respon terhadap stimulasi LH dan insulin, sel tersebut akan menghasilkan kadar androgen yang tinggi.

Masuknya LH ke dalam sel teka interstitial akan merangsang terjadinya sintesis dan sekresi dari androstenedion. Jumlah dari sekresi androgen akan mencerminkan kandungan dalam teka atau molekul regulator lainnya termasuk insulin, IGF-I, lipoprotein, aktivin dan inhibin. Sebagian dari androstenedion berdifusi menjadi cairan folikuler yang terakumulasi pada konsentrasi yang sangat tinggi. Sebagai respon terhadap induksi P450 dalam sel granulosa oleh stimulasi

FSH, androstenedion akan mengalami proses aromatisasi menjadi estrone, yang nantinya akan dikonversikan menjadi estradiol yang kemudian memberikan umpan balik ke hipofisa anterior agar GnRH memproduksi LH sehingga terjadi proses ovulasi. Perkembangan folikel atau folikulogenesis yang baik berakhir dengan ovulasi, yang merupakan hasil kerja sama yang kompleks antara hipotalamus dan hipofisa dengan umpan balik pada ovarium.

## 6.2. Kualitas Oosit

Kualitas oosit pada penderita endometriosis ektopik disini ditentukan berdasarkan keliling kompleks lapisan *cumulus oophorus* (*Cumulus Oocyte Complex*) yaitu sel-sel granulosa yang mengelilingi oosit dalam kondisi utuh (padat) atau tidak. Salah satu penyebab terjadinya penurunan angka fertilitas pada penderita endometriosis ektopik diduga karena adanya peningkatan ketebalan pada matriks ekstraseluler penyusun *cumulus oophorus* (*Cumulus Oophorus Complex*) yang berakibat pada sulitnya sel spermatozoa untuk melakukan penetrasi pada oosit hingga sampai terjadinya proses fertilisasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan kualitas oosit dalam hal ini adalah keliling *cumulus oophorus*. Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai nilai rata-rata keliling *cumulus oophorus* paling tinggi yaitu sebesar 3,8 cm diikuti dengan kelompok mencit



penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) sebesar 3,60 cm, kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) sebesar 3,07 cm dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) sebesar 2,98 cm.

Hal ini menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dapat memberikan suplai nutrisi kepada oosit lebih baik daripada kelompok perlakuan lain dan kelompok kontrol, secara langsung hal ini akan berakibat pada pertumbuhan oosit menjadi lebih baik pula sehingga ketika dilakukan fertilisasi maka oosit akan lebih sempurna dibuahi oleh spermatozoa membentuk *zygot* dan selanjutnya berkembang menjadi embrio. Sedangkan, pada kelompok mencit endometriosis ektopik dengan pemberian *placebo* (P0) tidak didapatkan oosit dari proses *ovum pick up* dikarenakan tidak adanya oosit yang diovulasikan.

Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dengan nilai rata-ran sebesar  $3,8 \pm 0,318$  ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dengan nilai rata-ran sebesar  $3,60 \pm 0,256$ . Sedangkan, pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) mempunyai nilai rata-ran sebesar  $3,07 \pm 0,125$  dan pada kelompok P1 ini tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) yang mempunyai nilai rata-ran sebesar  $2,98 \pm 0,239$ .

Hal ini menyatakan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) berbeda sangat nyata ( $p < 0,05$ ) dengan mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P3) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan adanya pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik diharapkan dapat memperbaiki kualitas oosit (keliling *Cumulus Oophorus Complex*) dengan cara menghambat terjadinya proses apoptosis sel granulosa melalui mekanisme modulasi beberapa target molekul *pro-inflammatory* pada mencit penderita endometriosis ektopik terutama TNF- $\alpha$ , enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *xanthine oxidase* sehingga dapat meningkatkan kadar GDF-9 dan menurunkan kadar hyaluronant pada mencit penderita endometriosis ektopik. Mekanisme penghambatan target molekul pada mencit penderita endometriosis ektopik oleh *curcumin* ini diharapkan dapat memperbaiki proliferasi dan diferensiasi sel granulosa juga dapat memperbaiki ekspansi kumulus yang secara langsung dapat meningkatkan kualitas oosit yaitu meningkatkan keliling *Cumulus Oophorus Complex* (COC).

### 6.3. Angka Fertilisasi

Fertilisasi *in vitro* adalah suatu proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan spermatozoa dan ovum diluar tubuh dalam

suatu media biakan (Widjiati dkk., 2004). Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu proses fertilisasi yang rumit. Kerumitan teknik fertilisasi *in vitro* ini terletak pada pengendalian kondisi kedua obyek utama yaitu sperma dan oosit. Masing-masing kedua obyek ini memerlukan penanganan khusus. Spermatozoa perlu mendapatkan perlakuan seperti layaknya kapasitas pada proses fertilisasi *in vivo*. Dalam proses pematangan oosit dan perkembangan embrio secara *in vitro*, diperlukan media yang dapat berfungsi sebagai tempat penyediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit. Menurut Hunter (1995), media biakan untuk tempat fertilisasi *in vitro* harus mendekati sama seperti kondisi lingkungan *in vivo* dalam saluran reproduksi hewan betina dan harus mempunyai kemampuan merangsang perkembangan embrio.

Fertilisasi adalah bersatunya pronukleus jantan dan pronukleus betina yang diwakili dengan interaksi spesifik sampai terbentuknya sebuah sel baru yang disebut *zygote*. Interaksi ini melibatkan terdapatnya reseptor pada spermatozoa dan ovum. Ovum memiliki lapisan ekstraseluler yang disebut zona pelusida yang mengandung beberapa glikoprotein (Hafez, 2000). Angka fertilisasi adalah banyaknya jumlah oosit yang dapat difertilisasi oleh spermatozoa hingga dapat menghasilkan sel baru yaitu *zygote* dan kemudian berkembang menjadi embrio pada proses fertilisasi *in vitro* selama 20-24 jam massa inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C (Widjiati dkk., 2000), dan sampai berkembang menjadi embrio satu dan dua sel dalam medium buatan fertilisasi *in vitro* atau dalam lingkungan *in vivo* dengan proses fertilisasi secara *in vivo*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik berpengaruh sangat nyata terhadap peningkatan angka fertilisasi. Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) menunjukkan bahwa kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai nilai rata-rata jumlah embrio dua sel paling tinggi yaitu sebesar  $100 \pm 0$ , diikuti dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) sebesar  $90,83 \pm 11,14$  dibandingkan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN). Sedangkan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) mempunyai nilai rata-rata jumlah zygote paling tinggi yaitu masing-masing sebesar  $87,50 \pm 20,91$  dan  $65 \pm 36,87$  dibandingkan kelompok perlakuan yang lainnya dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) juga mempunyai nilai rata-rata jumlah oosit yang tidak terfertilisasi paling tinggi sebesar  $5,83 \pm 10,20$ .

*Unfertilized* (tidak terfertilisasi) adalah suatu bentuk kegagalan fertilisasi yang terjadi pada beberapa sel telur pada kelompok kontrol maupun perlakuan yang dilakukan secara fertilisasi *in vitro* dengan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis mencit jantan dari galur yang sama. Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) menyatakan bahwa pada angka fertilisasi dengan sel telur yang tidak dapat dibuahi atau *unfertilized* menunjukkan hasil tidak ada perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) antara kelompok kontrol dengan kelompok

perlakuan. Pada kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) jumlah sel telur yang tidak terfertilisasi (*unfertilized*) mempunyai persentase sebesar 5,83% dan kemudian diikuti dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan persentase sebesar 3,33%.

Sedangkan, pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai persentase masing-masing sebesar 0%. Bentuk kegagalan fertilisasi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti : kualitas oosit dan spermatozoa yang buruk, media biakan fertilisasi *in vitro* yang kurang mendukung dan kurang stabil, pH media kurang stabil, temperature, dan nutrisi yang kurang memenuhi juga kondisi lainnya yang mempengaruhi proses fertilisasi *in vitro* (Widjiati dkk., 2000). Pada penelitian ini kemungkinan terjadinya kegagalan fertilisasi pada kelompok perlakuan maupun kontrol dikarenakan kualitas oosit yang kurang bagus dan dimungkinkan dosis *curcumin* yang diberikan cukup efektif sehingga pada pemberian dosis tertentu tidak didapatkan sel telur yang mengalami kegagalan fertilisasi.

*Zygote* adalah sel tunggal yang terbentuk sebagai hasil bersatunya sel telur dan sel spermatozoa dalam proses fertilisasi *in vitro* selama masa inkubasi 20-24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5°C. Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) menyatakan bahwa pada angka fertilisasi pada embrio satu sel atau zigot menunjukkan hasil terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pada

kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) mempunyai nilai persentase paling tinggi yaitu sebesar  $87,50\% \pm 20,91$  dan kemudian diikuti dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) persentase sebesar  $65\% \pm 36,87$ , antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dengan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara keduanya.

Sedangkan, pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai persentase masing-masing sebesar  $9,16\% \pm 11,14$  dan  $0\% \pm 0$  juga tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) antara kedua kelompok perlakuan tersebut. Namun antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ).

Embrio satu sel atau *zygote* yang diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% dengan suhu  $38,5^\circ\text{C}$  selama 20-24 jam banyak ditemukan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1), hal ini membuktikan bahwa dengan pemberian *curcumin* dengan dosis pemberian sebesar 24 mg/Kg BB/hari dapat meningkatkan terjadinya angka

fertilisasi pada mencit penderita endometriosis ektopik dan pemberian *curcumin* dengan dosis sebesar 24 mg/Kg BB/hari ini sudah cukup dapat mengembalikan fertilitas mencit seperti pada kelompok mencit tanpa perlakuan (KN).

Embrio dua sel terdiri adalah embrio yang terdiri dari dua sel blastomer yang berasal dari bertemunya sel telur dengan sel spermatozoa dalam proses fertilisasi *in vitro*. Berdasarkan hasil perhitungan *Analysis of Variant* (ANOVA) menyatakan bahwa pada angka fertilisasi pada embrio dua sel menunjukkan hasil terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) mempunyai nilai persentase paling tinggi yaitu sebesar  $100\% \pm 0$  dan kemudian diikuti dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dengan presentase sebesar  $90,83 \pm 11,14$ , antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara keduanya.

Sedangkan, pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) mempunyai persentase masing-masing sebesar  $29,16 \pm 31,37$  dan  $9,16\% \pm 14,97$  juga tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) antara kedua kelompok perlakuan tersebut. Namun antara kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dan

kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dengan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 24 mg/Kg BB/hari (P1) dan kelompok mencit tanpa perlakuan (KN) terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,05$ ) .

Pada penderita endometriosis ektopik terjadi suatu keadaan penurunan kadar sekresi GDF-9 akibat terjadinya apoptosis sel granulosa yang menyebabkan oosit melakukan suatu respon adaptasi atau homeostatis terhadap kondisi tersebut dengan cara meningkatkan stimulasi produksi hyaluronant. Hyaluronant merupakan komponen dominan pada matriks ekstraseluler yang berguna untuk mempersiapkan dan melindungi oosit terhadap enzim proteolitik dan stress mekanik saat ovulasi, namun dengan tingginya kadar *hyaluronant* dapat berakibat menjadi lebih banyak dan tebal ikatan matrik ekstraseluler pada kumulus dan zona pelusida sebagai kompensasi oosit untuk dapat tetap mempertahankan diri dari stres mekanik. Hal ini akan mengganggu terjadinya ekspansi kumulus terutama penetrasi spermatozoa dengan oosit dan fertilisasi (Anwar, 2005).

Saat terjadi ovulasi, oosit yang dilepaskan oleh ovarium terperangkap oleh fimbriae, selanjutnya akan masuk ke tuba falopii untuk bertemu dengan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi. Tempat pertemuan ovum dengan spermatozoa terjadi dibagian caudal ampulla atau di sepertiga atas tuba falopii. Saat bertemu dengan spermatozoa ovum masih terbungkus oleh sel-sel granulosa yang dilepaskan oleh folikel de Graaf dan sel-sel tersebut adalah sel *cumulus oophorus* yang berasal dari folikel dan zona pelusida yang langsung menyelubungi oosit. Untuk dapat mencapai inti, spermatozoa harus menembus



lapisan sel granulosa, zona pelusida dan membrane vitellin (Kurniati, dkk, 2006). Menurut Ismudiono (1999), proses fertilisasi memerlukan tiga kejadian kritis yaitu : 1). Spermatozoa harus menembus diantara cumulus, 2) spermatozoa harus menyentuh dan menembus lapisan zona pelusida, 3) penyatuan spermatozoa dengan membrane plasma oosit (membrane vitellina).

Menurut Bearden dan Fuquay (1992), pada tahap pertama dari proses fertilisasi melibatkan penetrasi korona dan sel-sel cumulus oophorus oleh spermatozoa dengan mengeluarkannya enzim hyaluronidase yang akan mencerna asam hyaluronat yang terdapat diantara sel-sel kumulus. Asam hyaluronat ini dihasilkan oleh sel-sel granulosa selama perkembangan di dalam folikel di ovarium. Setelah menembus sel-sel *cumulus*, spermatozoa berikatan dengan zona pelusida melalui ikatan semacam antigen-reseptor yang bersifat spesifik. Kedua enzim yaitu hyalunonidase dan akrosin tersebut berasal dari kepala spermatozoa (Kurniati dkk., 2006).

Pada tahap kedua, terjadi penetrasi spermatozoa pada zona pelusida, reaksi penetrasi spermatozoa pada zona pelusida ini menyerupahi reaksi antara antigen dengan reseptornya, dimana yang bertindak sebagai antigen adalah protein-protein yang ada pada membra plasma spermatozoa dan sebagai reseptornya adalah glikoprotein pada zona pelusida. Terdapat tiga jenis glikoprotein pada mamalia yaitu ZP1,ZP2, dan ZP3. Glikoprotein ZP1 berfungsi sebagai kerangka untuk berikatan dengan ZP2 dan ZP3. Glikoprotein ZP3 bertindak sebagai reseptor primer bagi ikatan spermatozoa-zona pelusida ikatan spermatozoa-ZP3 akan merangsang reaksi akrosom dan pengeluaran enzim-enzim hidrolitik.

Enzim-enzim akan berperan dalam meluruhkan dan mencerna zona pelusida sehingga dapat ditembus. Selanjutnya spermatozoa akan melakukan penetrasi pada selaput vitellin dari ovum saapi terjadinya fertilisasi (Kurniati, dkk, 2006).

Kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) dan kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) dapat meningkatkan angka fertilisasi terutama pada pembentukan embrio dua sel selama masa inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 38,5<sup>0</sup> C selama 20-24 jam. Hal ini merupakan buktikan bahwa pada dosis 48 mg/Kg BB/hari dan 36 mg/Kg BB/hari *curcumin* efektif diberikan pada mencit penderita endometriosis ektopik untuk meningkatkan angka fertilisasi.

Perbedaan efektifitas pemberian *curcumin* pada dosis 48 mg/Kg BB/hari dan 36 mg/Kg BB/hari adalah pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 48 mg/Kg BB/hari (P3) didapatkan 100% pengelembungan kantong fertilisasi pada semua sisi kanan dan kiri sedangkan pada kelompok mencit penderita endometriosis ektopik yang diberi *curcumin* sebesar 36 mg/Kg BB/hari (P2) didapatkan 50% kedua sisi tuba falopii terjadi pengelembungan kantong fertilisasi dan 50% lainnya hanya satu sisi dari kantong fertilisasi yang mengalami penggelambungan. Kantong fertilisasi pada tuba falopii ini menunjukkan bahwa mencit tersebut mengalami ovulasi. Pengelembungan kantong fertilisasi tersebut dikarenakan tuba falopii berisi cairan folikuler. Cairan folikuler adalah eksudat dari plasma yang merupakan hasil sekresi dari sel oosit dan sel granulosa. Cairan tersebut merupakan medium yang

merupakan residu sel granulosa dan oosit serta molekul-molekul regulator harus melewatinya untuk keluar dari dan melalui membrane folikel (Anwar, 2005).

*Curcumin* merupakan salah satu pengobatan herbal yang mampu menekan jalur NF- $\kappa$ B dan gen NF- $\kappa$ B *target cytokines* pada penderita endometriosis, Wieser *et al.*, (2007) mendemonstrasikan efek *curcumin* pada sel stroma endometriosis, *curcumin* menghambat induksi sitokin *pro-inflammatory*, sitokin angiogenik dan *macrophag migration inhibitory factor* oleh NF- $\kappa$ B pada model *in vitro*. Beberapa penelitian terbaru juga menyebutkan efek modulasi *curcumin* terhadap beberapa target molekul penting (TNF, IL-1, IL-6) dan enzim (COX-2), (Wieser *et al.*, 2007). Selain itu *curcumin* juga dapat menurunkan ekspresi gen anti apoptosis, efek anti oksidan dan efek anti angiogenesis (Sharma *et al.*, 2005; Joe *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *curcumin* pada mencit penderita endometrisosis ektopik dapat meningkatkan angka fertilisasi dengan cara melakukan penghambatan sekresi TNF- $\alpha$  dan sitokin *pro-inflammatory* yang berlebihan. Menurut Carlberg *et al.*, (2000), meningkatnya kadar TNF- $\alpha$  dan sitokin *pro-inflammatory* yang berlebihan pada mencit penderita endometriosis ektopik berdampak pada penurunan kualitas oosit karena terjadi penuruna proliferasi dan diferensiasi sel granulosa akibat turunnya kadar GDF-9, *over mature* pada oosit akibat tingginya kadar hyaluronant, terganggunya motilitas sperma, interaksi sperma-ooisit pada proses fertilisasi dan perkembangan embrio, sehingga dengan adanya mekanisme modulasi sitokin TNF- $\alpha$  dan *pro-inflammatory* dapat meningkatkan angka fertilisasi.

Penghambatan sekresi TNF- $\alpha$  dan sitokin *pro-inflammatory* yang berlebihan melalui penekanan jalur NF- $\kappa$ B dan gen NF- $\kappa$ B target *cytokines* oleh *curcumin* pada mencit penderita endometriosis ektopik melalui mekanisme modulasi beberapa target molekul *pro-inflammatory* pada mencit penderita endometriosis ektopik terutama target molekul TNF- $\alpha$ , enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) dan *xanthine oxidase* yang dapat menurunkan terjadinya apoptosis sel granulosa yang secara langsung dapat meningkatkan kadar GDF-9 dan menurunkan kadar hyaluronant pada mencit penderita endometriosis ektopik.

Mekanisme modulasi target molekul pada mencit penderita endometriosis ektopik oleh *curcumin* ini telah terbukti dapat memperbaiki proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, menstabilkan ikatan matriks ekstraseluler dan ekspansi kumulus untuk memberi nutrisi yang cukup bagi oosit, motilitas sperma tidak terganggu dengan adanya sitokin *pro-inflammatory*, interaksi sperma-oosit pada proses fertilisasi juga dapat berjalan dengan baik karena ikatan ekstraseluler pada kumulus menjadi stabil sehingga dapat memperbaiki kualitas oosit dan memudahkan spermatozoa untuk menembus sel telur pada saat fertilisasi pada mencit penderita endometriosis ektopik.

**BAB 7**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB. 7 KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Pemberian *curcumin* sangat efektif untuk meningkatkan fertilitas (profil folikulogenesis, kualitas oosit dan angka fertilisasi) pada mencit penderita endometriosis ektopik melalui mekanisme modulasi beberapa sitokin salah satunya adalah TNF- $\alpha$ , NF-kB dan COX-2

1. Pemberian *curcumin* sangat efektif untuk meningkatkan profil folikulogenesis ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik.

Pemberian *curcumin* dengan dosis 48 mg/Kg BB/hr sangat efektif untuk meningkatkan profil folikulogenesis ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol lainnya.

2. Pemberian *curcumin* sangat efektif untuk meningkatkan kualitas oosit ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik.

Pemberian *curcumin* dengan dosis 48 mg/Kg BB/hr sangat efektif untuk meningkatkan kualitas oosit ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol lainnya.

3. Pemberian *curcumin* sangat efektif untuk meningkatkan angka fertilisasi ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik.

Pemberian *curcumin* dengan dosis 48 mg/Kg BB/hr sangat efektif untuk meningkatkan angka fertilisasi ( $p < 0,05$ ) pada mencit penderita endometriosis ektopik dibandingkan kelompok perlakuan dan kontrol lainnya.

## 7.2. Saran

Berdasarkan kesimpulan diatas, dapat disarankan sebagai berikut ini :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar *Folikel Stimulating Hormone* (FSH), dan *Luteinizing Hormone* (LH) pada plasma darah penderita endometriosis pada oosit penderita endometriosis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktifitas pengaruh pemberian dosis *curcumin* yang lebih tinggi dari 48 mg/Kg BB/hari terhadap fertilitas.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktifitas pengaruh pemberian *curcumin* terhadap viabilitas embrio pada proses fertilisasi *in vitro* pada mencit penderita endometriosis ektopik.

# DAFTAR PUSTAKA



## DAFTAR PUSTAKA

- <http://fix.coxmiami.edu.html>. 2009. *Fertilization in mammals*.
- Awwad J.T., RA Sayegh, XJ Tao. *The SCID mouse : an experimental model for endometriosis*. Human Reproduction. 1999 ; 14 (12) : 3107 – 11
- Anwar, R. 2005. *Morfologi dan Fungsi Ovarium. Subbagian Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi*. Fakultas Kedokteran Unniversitas Padjajaran. Bandung.
- Arlotto.1999. *In vitro reproduction of embryo for improved production*. Depatement of Theriogenologi. Faculty of Veterynary Science. University of Pretor. P:1-6.
- Barnhart KM, R Dunsmoor, MS Su and Coutifairis C, 20002. *Efect of endometriosis in vitro fertilization*. Fertil Steril 77 (6): 1148-1155.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3<sup>rd</sup> en. Prentice-Hall. Inc. New Jersey. P:67-137.
- Berkley karen J., N Dmitrieva., K S. Curtis., and R E. Papka. 2004. *Nerves of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis*. Neuroscience Program, Florida State University, Tallahassee, and Department of Neurobiology, Northeastern Ohio Universities College of Medicine, Rootstown.
- Debrock S., Vander P.S., Meuleman C., Moerman P.,Hill J.Q.,Dhooghe. 2002.*In vitro adhesion of endometrium to autologous peritoneal membranes effect of the cycle phase and stage of endometriosis*. Hum Reprod.P:17:2523-2528.
- ESHRE, 2006. *Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis*, <http://guidelines.endometriosis.org/>, European Society foe Human Reproduction and Embryologist.
- Firmawati A.2007. *Pengaruh Penambahan Isolat Tyrosin Kinase Pada Semen Beku Sapi Perah (Friesian Holstein) Terhadap Prosentase Fertilitas Pada Proses Fertilisasi in vitro*.Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

- Grummer R .2006. *Animal models in endometriosis research; human reproduction update* vol 12, no 5 pp.641-649.
- Gupta,S. 2008. *Pathophysiology, infertility of endometriosis.*  
<http://endometriosis.edu.html>.
- Hafez, E. S. E. 1993. *Folliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation: Transport and Survival of Gametes: Fertilization, In Reproduction in Farm Animal.* Hafez Edition G. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animal. 7<sup>th</sup>Ed.* Lippincott Taurus and Wilkins, Philadelphia.
- Hardjopranojoto.1995. *Ilmu Kemajiran pads Ternak.* Edisi I. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hendarto H. 2007. *Profil TNF- $\alpha$ , GDF-9 dan Hyaluronan Pada Gangguan Folikulogenesis Sebagai Gambaran Penurunan Kualitas Oosit Pasien Infertil Dengan Endometriosis.* Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Herliana Inna., Hendy Kendaro., Aulanni'am., dan M.S. Djati.2008. *Profil GDF9 (Growth Differential Factor 9) dan Hubungannya dengan PGE2 (Prostagaldin E2) dari Pasiens Endometriosis.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Hunter, R. H. F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik.* Penerbit IT13. Bandung.Pp: 13 -26, 41-45, 74-104.
- Ismudiono. 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak.* Lab Fisiologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan.
- Jobin C, C A Bradham, M P Russo, B Juma, A S Narula, D A Brenner, B R.Sartor 1999. *Curcumin blocks cytokine-mediated NF- $\kappa$ B Activation and proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I-  $\kappa$ B Kinase Activity.*The journal of Immunology, 163: 3474-3483.
- Joe B, M Vijaykumar and RB Lokes.2004. *Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action.*Critical review in food science and nutrition, 44: 97-111.

- Kurniati R., R Argani, dan RA Nugroho. 2006. Reproduksi dan Embriologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Mulawarwan. Samarinda. P:54-57.
- Kusumawati, D. 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Cetakan 1. Gajah Mada Press. Yogyakarta.
- Kyama CM, S Debrock, JM Mwenda and TM D'Hooghe. 2003. Review. *Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis*. Reproductive Biology and Endocrinology, 1:123.
- Liben P. 2003. Fungsi Estrogen, dalam seminar Fitoestrogen. Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Monk M. 1987. *Mammalian Development a Practical Approach*. IRL PRESS; Washington
- Nasu K, N Masakazu, U Tami, Y Akitoshi, T Noriyuki, and Narahara Nisashi. 2007. Application of Nuclear- $\kappa$ B inhibitor BAY 11-7085 for the treatment of endometriosis: an invitro study, Am J Physiol Endocrinol Metab 293: E16-E23
- Nurrochmad A. 2004. Pandangan Baru *Curcumin* dan Aktivitasnya sebagai Antikanker. Fakultas Farmasi. Universitas Gaja Mada. Yogyakarta.
- Pari, L. 2008. *Role of curcumin in health and disease*. <http://curcumin.tumeric/org>.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jurusan Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Permana Sjafril Vika, Hendarto Hendy, Suhartono DS .2007., Pengaruh pemberian siklosporin A sebagai penurun jumlah limfosit serum terhadap terjadinya implan endometriosis pada mencit, laporan penelitian bagian/SMF kebidanan dan penyakit kandungan FK UNAIR/RSU Dr Soetomo Surabaya
- Widjiati, B. S. Poemomo, E. M. Luqman, D. M. Endang dan M. Mafuchati. 2000. Pengantar Ilmu Mudigah, Embriologi Alat Kelamin, Alat Reproduksi Temak dan Fertilisasi. Lab. Fisiologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. P: 15-54.
- Widjiati, B. S. Poemomo, E. M. Luqman, D. M. Endang dan M. Mafuchati. 2004. Penuntun Embriologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.

Surabaya.

- Santoso, S. 2001. Buku Latihan SPSS Statistik Parametrik. Penerbit PT Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Salisbury, G. W. and N. L. Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (*Physiology Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*). Diterjemahkan oleh Djanuar, R. Universitas Gadjadara Press. P:460.
- Samsulhadi. 2002. Dari Biomolekuler sampai masalah klinis. *Majalah Obstetri Ginekologi* ; 10 (1) : 43 – 50.
- Sandur SK, MK Pandey and B Sung. 2007. *Curcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through ROS-independent mechanism*. *Carcinogenesis* vol 28 no.7 pp. 1765-1773.
- Sarwono B. 2009. Buku Pintar Pemeliharaan Kelinci dan Rodensia. *Majalah Flona* PT. Samindra Utama. Jakarta.
- Sharma R.A, Gescher A.J, Steward W.P. 2005. *Curcumin the story so far*, *European Journal of cancer* 41, 1955-1968.
- Speroff L., and M A Fritz. 2005. *Imunobiology of endometriosis*, *Clinical Gynecology and infertility*, seventh edition, p 1106-1108.
- Splitterj, G. A., H. Kirk., W. F. Enziea Mack., and C. A. Rawlings. 2004. *Endometriosis in four irradiated rhesus monkeys*. *Veterinary Science Division and radiobiology Division, USAF School of Aerospace Medicine, Aerospace Medical Division, AFSC, United States Air Force Brooks Air Force Base. Tex.*
- Suprihatin, T. 2008. Korelasi antara Oosit Domba yang Dikoleksi dari Rumah Potong Hewan dengan Tingkat Fertilitasnya setelah Fertilisasi *in vitro*. *Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. Semarang.*
- Sutton, C, J Kevin, G. Adamson , David. *Pathogenesis of peritoneal endometriosis in Endometriosis. 2<sup>nd</sup> eds*. London and New York 2000 : 25 – 40.

- Thaller, C.D. and R.A. Cardulino.1995. The Mammalian Sperm Surface Moleculer and Cellular Aspect. In Gametes The Spermatozoon. Edited by JG. Grudzinskan and J.L. Porich. Cambridge University Press. P:20-44.
- Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi pda Ternak. Angkasa. Bandung.
- Wieser F, Cohen M, and A Gaeddert.2007. *Evolution of medical treatment for endometriosis: back to the roots?*.Human Reproduction Update, Vol 13, No.5 pp487-499.
- Wieser F, J L Vigne, I Ryan, D Hornung, S Djalali, R N Taylor.2005.*Sulindac Suppressed Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and RANTES gene and Protein Expression in Endometrial Stromal Cells from Women with Endometriosis.* The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90(12):6441-6447.
- Yagyu T, H Kobayasi, H Matsuzaki, K Wakahara, T Kondo, N Kurita, H Sekino, K Inagaki, M Suzuki, N Kanayama and T Terao.2005. *Thalidomide inhibits Tumor necrosis Factor- $\alpha$ -induced Interleukin-8 Expression in Endometriotic Stromal Cell, Possibly through Suppresion of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90(5):3017-3021.
- Zulfa.2002. Penyuntikan Suspensi Oosit Immatur Kambing Sebagai Antifertilitas terhadap Biometri Alat Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Betina.Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

**Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Sediaan Histologi Ovarium Mencit (*Mus musculus*) Dengan Pewarnaan Hematoxyllin-Eosin (Limbong, 2004).**

Untuk membuat sediaan histology, bahan yang digunakan adalah jaringan ovarium yang diambil dari masing-masing kelompok perlakuan dan control, kemudian dilakukan fiksasi dalam larutan formalin 10% dan selanjutnya diperlakukan melalui beberapa tahap kerja lanjutan,

1. **Fiksasi** : Dilakukan dengan menggunakan larutan buffer formalin 10%, ovarium direndam selama 24 jam.
2. Dipotong kecil ukuran 1x1x1 kemudian dicuci dengan air mengalir kurang lebih selama 30 detik.
3. **Pencucian** : Jaringan ovarium direndam tiga kali ke dalam etanol 70%
4. **Dehidrasi** : Jaringan ovarium direndam berturut-turut melalui etanol 70% satu jam, etanol 80% setelah dua jam, etanol 90% selama dua jam, etanol absolute 18 jam.
5. **Clearing** : Jaringan ovarium dimasukkan kedalam campuran etanol dan xylol (1:1) secara berturut-turut tiga kali selama setengah jam.
6. **Infiltrasi** : Mula-mula jaringan ovarium dimasukkan kedalam campuran paraffin dan xylol (1:1), setengah jam didalam alamri panas dengan temperature 65<sup>0</sup>C, kemudian jaringan ovarium dimasukkan ke dalam paraffin murni (cair) sebanyak tiga kali, selama 45 menit.
7. **Embinging** : Mencetak jaringan ovarium dengan cairan paraffin cair dan panas, dituangkan dalam cetakan besi berbentuk kubus. Kemudian jaringan ovarium

dimasukkan ke dalamnya dengan posisi yang teratur sebaik mungkin, dianginkan hingga paraffin menjadi beku.

8. **Trimming** : Bagian sudut-sudut yang runcing pada cetakan paraffin yang sudah beku dipotong untuk mempermudah proses pemotongan dengan mikrotom.

## **9. Pewarnaan HE**

# LAMPIRAN



**Lampiran 2. Hasil Perhitungan Folikulogenesis SPSS XII for Windows****Summarize****Case Processing Summary<sup>a</sup>**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Folikel Primer * Perlakuan	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
Folikel Sekunder * Perlakuan	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
Folikel Tersier * Perlakuan	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
Folikel de Graaf * Perlakuan	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%

<sup>a</sup>. Limited to first 100 cases.

Case Summaries <sup>a</sup>

			Folikel Primer	Folikel Sekunder	Folikel Tersier	Folikel de Graaf	
Perlakuan	KN	1	11,00	21,00	55,00	17,00	
		2	19,00	14,00	50,00	25,00	
		3	28,00	22,00	47,00	20,00	
		4	11,00	25,00	55,00	,00	
		5	20,00	22,00	52,00	,00	
		6	15,00	27,00	60,00	10,00	
		Total	Mean	17,0000	21,8333	53,1667	12,0000
			Median	17,0000	22,0000	53,5000	13,5000
			Std. Deviation	5,83085	4,44597	4,53505	10,48809
			N	6	6	6	6
		KP	1	12,00	25,00	58,00	12,00
			2	25,00	20,00	40,00	,00
			3	20,00	30,00	34,00	,00
			4	20,00	40,00	47,00	5,00
			5	18,00	30,00	46,00	,00
			6	20,00	40,00	50,00	,00
		Total	Mean	19,1667	30,8333	45,8333	2,8333
			Median	20,0000	30,0000	46,5000	,0000
			Std. Deviation	4,21505	8,01041	8,25631	4,91596
			N	6	6	6	6
		P1	1	15,00	32,00	38,00	16,00
			2	21,00	28,00	36,00	14,00
			3	20,00	24,00	41,00	18,00
			4	8,00	27,00	52,00	19,00
	5		18,00	29,00	47,00	19,00	
	6		27,00	27,00	56,00	20,00	
	Total	Mean	18,1667	27,8333	45,0000	17,6667	
		Median	19,0000	27,5000	44,0000	18,5000	
		Std. Deviation	6,36920	2,63944	8,00000	2,25093	
		N	6	6	6	6	
	P2	1	19,00	11,00	36,00	28,00	
		2	28,00	31,00	35,00	28,00	
		3	17,00	23,00	34,00	24,00	
		4	15,00	29,00	33,00	33,00	
		5	15,00	28,00	46,00	14,00	
		6	6,00	25,00	36,00	10,00	
	Total	Mean	16,3333	24,5000	36,6667	22,8333	
		Median	16,0000	28,5000	35,5000	28,0000	
		Std. Deviation	6,50128	7,20417	4,71876	8,95358	
		N	6	6	6	6	
	P3	1	,00	19,00	40,00	24,00	
		2	15,00	10,00	33,00	28,00	
		3	16,00	9,00	38,00	33,00	
		4	13,00	12,00	34,00	21,00	
		5	24,00	15,00	34,00	23,00	
		6	,00	23,00	33,00	15,00	
	Total	Mean	11,3333	14,6667	35,3333	24,0000	
		Median	14,0000	13,5000	34,0000	23,5000	
		Std. Deviation	9,54289	5,46504	2,94392	6,13188	
		N	6	6	6	6	
	Total	Mean	16,4000	23,9333	43,2000	15,8667	
		Median	17,5000	25,0000	40,5000	17,5000	
		Std. Deviation	6,82086	7,84300	8,71542	10,34152	
		N	30	30	30	30	

Folikulogenesis

a. Limited to first 100 cases.

**Oneway**

**Descriptives**

Folikel Primer

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	17,0000	5,83095	2,38048	10,8808	23,1192	11,00	26,00
KP	6	19,1667	4,21505	1,72079	14,7432	23,5901	12,00	25,00
P1	6	18,1667	6,36920	2,60021	11,4826	24,8507	8,00	27,00
P2	6	18,3333	6,50128	2,65414	9,5107	23,1560	6,00	26,00
P3	6	11,3333	9,54289	3,89587	1,3187	21,3480	,00	24,00
Total	30	16,4000	8,82086	1,24531	13,8530	18,9470	,00	27,00

**Test of Homogeneity of Variances**

Folikel Primer

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,201	4	25	,335

**ANOVA**

Folikel Primer

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	220,867	4	55,217	1,223	,326
Within Groups	1128,333	25	45,133		
Total	1349,200	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Folikel Primer

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	-2,16667	3,87872	,581	-10,1550	5,8217
		P1	-1,16667	3,87872	,766	-9,1550	6,8217
		P2	,66667	3,87872	,865	-7,3217	8,6550
		P3	5,66667	3,87872	,156	-2,3217	13,6550
	KP	KN	2,16667	3,87872	,581	-5,8217	10,1550
		P1	1,00000	3,87872	,799	-6,9884	8,9884
		P2	2,83333	3,87872	,472	-5,1550	10,8217
		P3	7,83333	3,87872	,054	-,1550	15,8217
	P1	KN	1,16667	3,87872	,766	-6,8217	9,1550
		KP	-1,00000	3,87872	,799	-8,9884	6,9884
		P2	1,83333	3,87872	,641	-6,1550	9,8217
		P3	6,83333	3,87872	,090	-1,1550	14,8217
	P2	KN	-,66667	3,87872	,865	-8,6550	7,3217
		KP	-2,83333	3,87872	,472	-10,8217	5,1550
		P1	-1,83333	3,87872	,641	-9,8217	6,1550
		P3	5,00000	3,87872	,209	-2,9884	12,9884
	P3	KN	-5,66667	3,87872	,156	-13,6550	2,3217
		KP	-7,83333	3,87872	,054	-15,8217	,1550
		P1	-6,83333	3,87872	,090	-14,8217	1,1550
		P2	-5,00000	3,87872	,209	-12,9884	2,9884
Bonferroni	KN	KP	-2,16667	3,87872	1,000	-14,1061	9,7728
		P1	-1,16667	3,87872	1,000	-13,1061	10,7728
		P2	,66667	3,87872	1,000	-11,2728	12,6061
		P3	5,66667	3,87872	1,000	-6,2728	17,6061
	KP	KN	2,16667	3,87872	1,000	-9,7728	14,1061
		P1	1,00000	3,87872	1,000	-10,9395	12,9395
		P2	2,83333	3,87872	1,000	-9,1061	14,7728
		P3	7,83333	3,87872	,543	-4,1061	19,7728
	P1	KN	1,16667	3,87872	1,000	-10,7728	13,1061
		KP	-1,00000	3,87872	1,000	-12,9395	10,9395
		P2	1,83333	3,87872	1,000	-10,1061	13,7728
		P3	6,83333	3,87872	,903	-5,1061	18,7728
	P2	KN	-,66667	3,87872	1,000	-12,6061	11,2728
		KP	-2,83333	3,87872	1,000	-14,7728	9,1061
		P1	-1,83333	3,87872	1,000	-13,7728	10,1061
		P3	5,00000	3,87872	1,000	-6,9395	16,9395
	P3	KN	-5,66667	3,87872	1,000	-17,6061	6,2728
		KP	-7,83333	3,87872	,543	-19,7728	4,1061
		P1	-6,83333	3,87872	,903	-18,7728	5,1061
		P2	-5,00000	3,87872	1,000	-16,9395	6,9395

**Oneway****Descriptives**

Folikel Sekunder

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	21,8333	4,44597	1,81506	17,1676	26,4991	14,00	27,00
KP	6	30,8333	8,01041	3,27024	22,4269	39,2397	20,00	40,00
P1	6	27,8333	2,63944	1,07755	25,0634	30,6033	24,00	32,00
P2	6	24,5000	7,20417	2,94109	16,9397	32,0603	11,00	31,00
P3	6	14,6667	5,46504	2,23109	8,9315	20,4019	9,00	23,00
Total	30	23,9333	7,84300	1,43193	21,0047	26,8620	9,00	40,00

**Test of Homogeneity of Variances**

Folikel Sekunder

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,407	4	25	,261

**ANOVA**

Folikel Sekunder

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	920,533	4	230,133	6,664	,001
Within Groups	863,333	25	34,533		
Total	1783,867	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Folikel Sekunder

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	-9,00000*	3,39280	,014	-15,9876	-2,0124
		P1	-6,00000	3,39280	,089	-12,9876	,9876
		P2	-2,66667	3,39280	,439	-9,6543	4,3209
		P3	7,16667*	3,39280	,045	,1791	14,1543
	KP	KN	9,00000*	3,39280	,014	2,0124	15,9876
		P1	3,00000	3,39280	,385	-3,9876	9,9876
		P2	6,33333	3,39280	,074	-,6543	13,3209
		P3	16,16667*	3,39280	,000	9,1791	23,1543
	P1	KN	6,00000	3,39280	,089	-,9876	12,9876
		KP	-3,00000	3,39280	,385	-9,9876	3,9876
		P2	3,33333	3,39280	,335	-3,6543	10,3209
		P3	13,16667*	3,39280	,001	6,1791	20,1543
P2	KN	2,66667	3,39280	,439	-4,3209	9,6543	
	KP	-6,33333	3,39280	,074	-13,3209	,6543	
	P1	-3,33333	3,39280	,335	-10,3209	3,6543	
	P3	9,83333*	3,39280	,008	2,8457	16,8209	
P3	KN	-7,16667*	3,39280	,045	-14,1543	-,1791	
	KP	-16,16667*	3,39280	,000	-23,1543	-9,1791	
	P1	-13,16667*	3,39280	,001	-20,1543	-6,1791	
	P2	-9,83333*	3,39280	,008	-16,8209	-2,8457	
Bonferroni	KN	KP	-9,00000	3,39280	,137	-19,4437	1,4437
		P1	-6,00000	3,39280	,892	-16,4437	4,4437
		P2	-2,66667	3,39280	1,000	-13,1104	7,7771
		P3	7,16667	3,39280	,448	-3,2771	17,6104
	KP	KN	9,00000	3,39280	,137	-1,4437	19,4437
		P1	3,00000	3,39280	1,000	-7,4437	13,4437
		P2	6,33333	3,39280	,737	-4,1104	16,7771
		P3	16,16667*	3,39280	,001	5,7229	26,6104
	P1	KN	6,00000	3,39280	,892	-4,4437	16,4437
		KP	-3,00000	3,39280	1,000	-13,4437	7,4437
		P2	3,33333	3,39280	1,000	-7,1104	13,7771
		P3	13,16667*	3,39280	,007	2,7229	23,6104
P2	KN	2,66667	3,39280	1,000	-7,7771	13,1104	
	KP	-6,33333	3,39280	,737	-16,7771	4,1104	
	P1	-3,33333	3,39280	1,000	-13,7771	7,1104	
	P3	9,83333	3,39280	,077	-,6104	20,2771	
P3	KN	-7,16667	3,39280	,448	-17,6104	3,2771	
	KP	-16,16667*	3,39280	,001	-26,6104	-5,7229	
	P1	-13,16667*	3,39280	,007	-23,6104	-2,7229	
	P2	-9,83333	3,39280	,077	-20,2771	,6104	

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

Oneway

Descriptives

Folikel Tersier									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
KN	6	53,1687	4,53505	1,85143	48,4074	57,9259	47,00	60,00	
KP	6	35,3333	2,94392	1,20185	32,2439	38,4228	33,00	40,00	
P1	6	36,6667	4,71876	1,92642	31,7146	41,6187	33,00	46,00	
P2	6	45,0000	8,00000	3,26599	36,6045	53,3955	36,00	56,00	
P3	6	45,8333	8,25631	3,37062	37,1689	54,4978	34,00	58,00	
Total	30	43,2000	8,71542	1,59121	39,9456	46,4544	33,00	60,00	

Test of Homogeneity of Variances

Folikel Tersier			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,849	4	25	,151

ANOVA

Folikel Tersier					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1284,467	4	321,117	8,742	,000
Within Groups	918,333	25	36,733		
Total	2202,800	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Folikel Tersier

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	17,83333*	3,49921	,000	10,6266	25,0401
		P1	16,50000*	3,49921	,000	9,2932	23,7068
		P2	8,16667*	3,49921	,028	,9599	15,3734
		P3	7,33333*	3,49921	,046	,1266	14,5401
	KP	KN	-17,83333*	3,49921	,000	-25,0401	-10,6266
		P1	-1,33333	3,49921	,706	-8,5401	5,8734
		P2	-9,66667*	3,49921	,011	-16,8734	-2,4599
		P3	-10,50000*	3,49921	,006	-17,7068	-3,2932
	P1	KN	-16,50000*	3,49921	,000	-23,7068	-9,2932
		KP	1,33333	3,49921	,706	-5,8734	8,5401
		P2	-8,33333*	3,49921	,025	-15,5401	-1,1266
		P3	-9,16667*	3,49921	,015	-16,3734	-1,9599
	P2	KN	-8,16667*	3,49921	,028	-15,3734	-,9599
		KP	9,66667*	3,49921	,011	2,4599	16,8734
		P1	8,33333*	3,49921	,025	1,1266	15,5401
		P3	-,83333	3,49921	,814	-8,0401	6,3734
	P3	KN	-7,33333*	3,49921	,046	-14,5401	-,1266
		KP	10,50000*	3,49921	,006	3,2932	17,7068
		P1	9,16667*	3,49921	,015	1,9599	16,3734
		P2	,83333	3,49921	,814	-6,3734	8,0401
Bonferroni	KN	KP	17,83333*	3,49921	,000	7,0621	28,6046
		P1	16,50000*	3,49921	,001	5,7287	27,2713
		P2	8,16667	3,49921	,279	-2,6046	18,9379
		P3	7,33333	3,49921	,464	-3,4379	18,1046
	KP	KN	-17,83333*	3,49921	,000	-28,6046	-7,0621
		P1	-1,33333	3,49921	1,000	-12,1046	9,4379
		P2	-9,66667	3,49921	,106	-20,4379	1,1046
		P3	-10,50000	3,49921	,060	-21,2713	,2713
	P1	KN	-16,50000*	3,49921	,001	-27,2713	-5,7287
		KP	1,33333	3,49921	1,000	-9,4379	12,1046
		P2	-8,33333	3,49921	,252	-19,1046	2,4379
		P3	-9,16667	3,49921	,147	-19,9379	1,6046
	P2	KN	-8,16667	3,49921	,279	-18,9379	2,6046
		KP	9,66667	3,49921	,106	-1,1046	20,4379
		P1	8,33333	3,49921	,252	-2,4379	19,1046
		P3	-,83333	3,49921	1,000	-11,6046	9,9379
	P3	KN	-7,33333	3,49921	,464	-18,1046	3,4379
		KP	10,50000	3,49921	,060	-,2713	21,2713
		P1	9,16667	3,49921	,147	-1,6046	19,9379
		P2	,83333	3,49921	1,000	-9,9379	11,6046

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



**Oneway****Descriptives****Folikel de Graaf**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	12,0000	10,48809	4,28174	,9934	23,0066	,00	25,00
KP	6	2,8333	4,91596	2,00693	-2,3257	7,9923	,00	12,00
P1	6	17,6667	2,25093	,91894	15,3045	20,0289	14,00	20,00
P2	6	22,8333	8,95358	3,65529	13,4371	32,2295	10,00	33,00
P3	6	24,0000	6,13188	2,50333	17,5650	30,4350	15,00	33,00
Total	30	15,8667	10,34152	1,88810	12,0051	19,7283	,00	33,00

**Test of Homogeneity of Variances****Folikel de Graaf**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,771	4	25	,016

**ANOVA****Folikel de Graaf**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1816,467	4	454,117	8,835	,000
Within Groups	1285,000	25	51,400		
Total	3101,467	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Folikel de Graaf

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	9,16667*	4,13924	,036	,6417	17,6916
		P1	-5,66667	4,13924	,183	-14,1916	2,8583
		P2	-10,83333*	4,13924	,015	-19,3583	-2,3084
		P3	-12,00000*	4,13924	,008	-20,5249	-3,4751
	KP	KN	-9,16667*	4,13924	,036	-17,6916	-,6417
		P1	-14,83333*	4,13924	,001	-23,3583	-6,3084
		P2	-20,00000*	4,13924	,000	-28,5249	-11,4751
		P3	-21,16667*	4,13924	,000	-29,6916	-12,6417
	P1	KN	5,66667	4,13924	,183	-2,8583	14,1916
		KP	14,83333*	4,13924	,001	6,3084	23,3583
		P2	-5,16667	4,13924	,224	-13,6916	3,3583
		P3	-8,33333	4,13924	,139	-14,8583	2,1916
P2	KN	10,83333*	4,13924	,015	2,3084	19,3583	
	KP	20,00000*	4,13924	,000	11,4751	28,5249	
	P1	5,16667	4,13924	,224	-3,3583	13,6916	
	P3	-1,16667	4,13924	,780	-9,6916	7,3583	
P3	KN	12,00000*	4,13924	,008	3,4751	20,5249	
	KP	21,16667*	4,13924	,000	12,6417	29,6916	
	P1	6,33333	4,13924	,139	-2,1916	14,8583	
	P2	1,16667	4,13924	,780	-7,3583	9,6916	
Bonferroni	KN	KP	9,16667	4,13924	,361	-3,5747	21,9081
		P1	-5,66667	4,13924	1,000	-18,4081	7,0747
		P2	-10,83333	4,13924	,148	-23,5747	1,9081
		P3	-12,00000	4,13924	,077	-24,7414	,7414
	KP	KN	-9,16667	4,13924	,361	-21,9081	3,5747
		P1	-14,83333*	4,13924	,014	-27,5747	-2,0919
		P2	-20,00000*	4,13924	,001	-32,7414	-7,2586
		P3	-21,16667*	4,13924	,000	-33,9081	-8,4253
	P1	KN	5,66667	4,13924	1,000	-7,0747	18,4081
		KP	14,83333*	4,13924	,014	2,0919	27,5747
		P2	-5,16667	4,13924	1,000	-17,9081	7,5747
		P3	-6,33333	4,13924	1,000	-19,0747	6,4081
P2	KN	10,83333	4,13924	,148	-1,9081	23,5747	
	KP	20,00000*	4,13924	,001	7,2586	32,7414	
	P1	5,16667	4,13924	1,000	-7,5747	17,9081	
	P3	-1,16667	4,13924	1,000	-13,9081	11,5747	
P3	KN	12,00000	4,13924	,077	-,7414	24,7414	
	KP	21,16667*	4,13924	,000	8,4253	33,9081	
	P1	6,33333	4,13924	1,000	-6,4081	19,0747	
	P2	1,16667	4,13924	1,000	-11,5747	13,9081	

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

**Lampiran 3. Hasil Perhitungan Kualitas Oosit SPSS XII for Windows**

**Summarize**

**Case Processing Summary<sup>a</sup>**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Keliling Kumulus Ooporus * Perlakuan	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

**Case Summaries<sup>a</sup>**

			Keliling Kumulus Ooporus
Perlakuan	KN	1	3,13
		2	2,70
		3	2,70
		4	3,05
		5	3,30
		6	3,00
	Total	Median	3,0250
		Std. Deviation	,23958
		N	6
	P1	1	3,02
		2	3,30
		3	2,95
		4	3,05
5		3,13	
6		3,00	
Total	Median	3,0350	
	Std. Deviation	,12534	
	N	6	
P2	1	3,83	
	2	3,80	
	3	3,30	
	4	3,50	
	5	3,85	
	6	3,33	
Total	Median	3,6500	
	Std. Deviation	,25624	
	N	6	
P3	1	3,50	
	2	4,34	
	3	3,76	
	4	3,65	
	5	3,55	
	6	4,00	
Total	Median	3,7050	
	Std. Deviation	,31881	
	N	6	
Total	Median	3,3000	
	Std. Deviation	,42053	
	N	24	

Keliling Kumulus Ooporus

a. Limited to first 100 cases.

**Oneway**

**Descriptives**

Keliling Kumulus Ooporos

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	2,9800	,23958	,09781	2,7286	3,2314	2,70	3,30
P1	6	3,0750	,12534	,05117	2,9435	3,2065	2,95	3,30
P2	6	3,6017	,25624	,10461	3,3328	3,8706	3,30	3,85
P3	6	3,8000	,31881	,13015	3,4654	4,1346	3,50	4,34
Total	24	3,3642	,42053	,08584	3,1866	3,5417	2,70	4,34

**Test of Homogeneity of Variances**

Keliling Kumulus Ooporos

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,027	3	20	,143

**ANOVA**

Keliling Kumulus Ooporos

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,865	3	,955	15,892	,000
Within Groups	1,202	20	,060		
Total	4,067	23			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Keliling Kumulus Ooporus

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	P1	-,09500	,14154	,907	-,4912	,3012
	P2	-,62167*	,14154	,001	-1,0178	-,2255
	P3	-,82000*	,14154	,000	-1,2162	-,4238
P1	KN	,09500	,14154	,907	-,3012	,4912
	P2	-,52667*	,14154	,007	-,9228	-,1305
	P3	-,72500*	,14154	,000	-1,1212	-,3288
P2	KN	,62167*	,14154	,001	,2255	1,0178
	P1	,52667*	,14154	,007	,1305	,9228
	P3	-,19833	,14154	,513	-,5945	,1978
P3	KN	,82000*	,14154	,000	,4238	1,2162
	P1	,72500*	,14154	,000	,3288	1,1212
	P2	,19833	,14154	,513	-,1978	,5945

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

**Homogeneous Subsets**

**Keliling Kumulus Ooporus**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
KN	6	2,9800	
P1	6	3,0750	
P2	6		3,6017
P3	6		3,8000
Sig.		,907	,513

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Lampiran 4. Hasil Perhitungan Angka Fertilisasi SPSS XII for Windows**

**Summarize**

**Case Processing Summary<sup>a</sup>**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Angka Fertilisasi (Unfertilized) * Perlakuan	24	77,4%	7	22,6%	31	100,0%
Angka Fertilisasi (Satu Sel) * Perlakuan	24	77,4%	7	22,6%	31	100,0%
Angka Fertilisasi (Dua Sel) * Perlakuan	24	77,4%	7	22,6%	31	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

**Case Summaries<sup>a</sup>**

			Angka Fertilisasi (Unfertilized)	Angka Fertilisasi (Satu Sel)	Angka Fertilisasi (Dua Sel)	
Perlakuan	KN	1	,00	80,00	20,00	
		2	,00	100,00	,00	
		3	,00	100,00	,00	
		4	,00	25,00	75,00	
		5	25,00	15,00	60,00	
		6	10,00	70,00	20,00	
		Total	Median	,0000	75,0000	20,0000
			Std. Deviation	10,20621	36,87818	31,37143
			N	6	6	6
	P1	1	,00	100,00	,00	
		2	5,00	75,00	20,00	
		3	15,00	50,00	35,00	
		4	,00	100,00	,00	
		5	,00	100,00	,00	
		6	,00	100,00	,00	
	Total	Median	,0000	100,0000	,0000	
		Std. Deviation	6,05530	20,91650	14,97220	
		N	6	6	6	
P2	1	,00	,00	100,00		
	2	,00	10,00	90,00		
	3	,00	25,00	75,00		
	4	,00	20,00	80,00		
	5	,00	,00	100,00		
	6	,00	,00	100,00		
	Total	Median	,0000	5,0000	95,0000	
		Std. Deviation	,00000	11,14301	11,14301	
		N	6	6	6	
P3	1	,00	,00	100,00		
	2	,00	,00	100,00		
	3	,00	,00	100,00		
	4	,00	,00	100,00		
	5	,00	,00	100,00		
	6	,00	,00	100,00		
	Total	Median	,0000	,0000	100,0000	
		Std. Deviation	,00000	,00000	,00000	
		N	6	6	6	
Total	Median	,0000	22,5000	75,0000		
	Std. Deviation	6,07546	42,83225	43,23795		
	N	24	24	24		

Angka Fertilisasi

a. Limited to first 100 cases.

**Oneway****Descriptives****Angka Fertilisasi (Unfertilized)**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	5,8333	10,20621	4,16667	-4,8774	16,5441	,00	25,00
P1	6	3,3333	6,05530	2,47207	-3,0213	9,6880	,00	15,00
P2	6	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
P3	6	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	24	2,2917	6,07546	1,24015	-,2738	4,8571	,00	25,00

**Test of Homogeneity of Variances****Angka Fertilisasi (Unfertilized)**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,706	3	20	,001

**ANOVA****Angka Fertilisasi (Unfertilized)**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	144,792	3	48,264	1,371	,280
Within Groups	704,167	20	35,208		
Total	848,958	23			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Angka Fertilisasi (Unfertilized)

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	P1	2,50000	3,42580	,884	-7,0886	12,0886
	P2	5,83333	3,42580	,348	-3,7553	15,4219
	P3	5,83333	3,42580	,348	-3,7553	15,4219
P1	KN	-2,50000	3,42580	,884	-12,0886	7,0886
	P2	3,33333	3,42580	,766	-6,2553	12,9219
	P3	3,33333	3,42580	,766	-6,2553	12,9219
P2	KN	-5,83333	3,42580	,348	-15,4219	3,7553
	P1	-3,33333	3,42580	,766	-12,9219	6,2553
	P3	,00000	3,42580	1,000	-9,5886	9,5886
P3	KN	-5,83333	3,42580	,348	-15,4219	3,7553
	P1	-3,33333	3,42580	,766	-12,9219	6,2553
	P2	,00000	3,42580	1,000	-9,5886	9,5886

**Homogeneous Subsets**

Angka Fertilisasi (Unfertilized)

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05
		1
P2	6	,0000
P3	6	,0000
P1	6	3,3333
KN	6	5,8333
Sig.		,348

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.



**Oneway****Descriptives**

Angka Fertilisasi (Satu Sel)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	65,0000	36,87818	15,05545	26,2987	103,7013	15,00	100,00
P1	6	87,5000	20,91650	8,53913	65,5495	109,4505	50,00	100,00
P2	6	9,1667	11,14301	4,54911	-2,5272	20,8605	,00	25,00
P3	6	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	24	40,4167	42,83225	8,74310	22,3302	58,5031	,00	100,00

**Test of Homogeneity of Variances**

Angka Fertilisasi (Satu Sel)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9,472	3	20	,000

**ANOVA**

Angka Fertilisasi (Satu Sel)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32587,500	3	10862,500	22,611	,000
Within Groups	9608,333	20	480,417		
Total	42195,833	23			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Angka Fertilisasi (Satu Sel)

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	P1	-22,50000	12,65460	,312	-57,9194	12,9194
	P2	55,83333*	12,65460	,001	20,4139	91,2528
	P3	65,00000*	12,65460	,000	29,5806	100,4194
P1	KN	22,50000	12,65460	,312	-12,9194	57,9194
	P2	78,33333*	12,65460	,000	42,9139	113,7528
	P3	87,50000*	12,65460	,000	52,0806	122,9194
P2	KN	-55,83333*	12,65460	,001	-91,2528	-20,4139
	P1	-78,33333*	12,65460	,000	-113,7528	-42,9139
	P3	9,16667	12,65460	,886	-26,2528	44,5861
P3	KN	-65,00000*	12,65460	,000	-100,4194	-29,5806
	P1	-87,50000*	12,65460	,000	-122,9194	-52,0806
	P2	-9,16667	12,65460	,886	-44,5861	26,2528

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

**Homogeneous Subsets**

**Angka Fertilisasi (Satu Sel)**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
P3	6	,0000	
P2	6	9,1667	
KN	6		65,0000
P1	6		87,5000
Sig.		,886	,312

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

## Oneway

## Descriptives

## Angka Fertilisasi (Dua Sel)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	6	29,1667	31,37143	12,80733	-3,7556	62,0890	,00	75,00
P1	6	9,1667	14,97220	6,11237	-8,5457	24,8790	,00	35,00
P2	6	90,8333	11,14301	4,54911	79,1395	102,5272	75,00	100,00
P3	6	100,0000	,00000	,00000	100,0000	100,0000	100,00	100,00
Total	24	57,2917	43,23795	8,82591	39,0339	75,5494	,00	100,00

## Test of Homogeneity of Variances

## Angka Fertilisasi (Dua Sel)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9,990	3	20	,000

## ANOVA

## Angka Fertilisasi (Dua Sel)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36336,458	3	12112,153	36,359	,000
Within Groups	6662,500	20	333,125		
Total	42998,958	23			

**Post Hoc Tests**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Angka Fertilisasi (Dua Sel)

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KN	P1	20,00000	10,53763	,260	-9,4942	49,4942
	P2	-61,66667*	10,53763	,000	-91,1608	-32,1725
	P3	-70,83333*	10,53763	,000	-100,3275	-41,3392
P1	KN	-20,00000	10,53763	,260	-49,4942	9,4942
	P2	-81,66667*	10,53763	,000	-111,1608	-52,1725
	P3	-90,83333*	10,53763	,000	-120,3275	-61,3392
P2	KN	61,66667*	10,53763	,000	32,1725	91,1608
	P1	81,66667*	10,53763	,000	52,1725	111,1608
	P3	-9,16667	10,53763	,820	-38,6608	20,3275
P3	KN	70,83333*	10,53763	,000	41,3392	100,3275
	P1	90,83333*	10,53763	,000	61,3392	120,3275
	P2	9,16667	10,53763	,820	-20,3275	38,6608

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

**Homogeneous Subsets**

**Angka Fertilisasi (Dua Sel)**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
P1	6	9,1667	
KN	6	29,1667	
P2	6		90,8333
P3	6		100,0000
Sig.		,260	,820

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

**Lampiran 5. Komposisi Reagensia Fertilisasi *in vitro*****Komposisi MEM (per 100 ml)**

MEM Powder	0,95 gram
Na HCO <sub>3</sub>	0,22 gram
Gentamycin 50µg/ul	1,0 µl/ml
DW	100 ml
BSA (3-5%)	3-5 ml

**Lampiran 6. Perhitungan Dosis**

Konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia

(Kusumawati, 2004).

	Mencit 20 g	Tikus 20 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 Kg	Kucing 2 Kg	Kera 4 Kg	Anjing 12 Kg	Manusia 70 Kg
Mencit 20 g	1,0	70	1225	2780	2970	6410	12420	38790
Tikus 20 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	1,78	5,6
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	1,02	3,15
Kelinci 1,5 Kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	1,42
Kucing 2 Kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	1,3
Kera 4 Kg	0,016	0,11	0,19	0,43	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 Kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 Kg	<b>0,0026</b>	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,6

Berdasarkan penelitian Kuswojo (2009) yang memakai *curcumin* sebagai pengobatan terhadap endometriosis dengan dosis 1846 mg/70 Kg BB/hari pada manusia, maka pada penelitian ini diperlukan perhitungan dosis untuk mencit adalah sebagai berikut ini :

P1 :  $1846 \text{ mg}/70 \text{ Kg BB/hr} \times 0,0026 = 4,8 \text{ mg}/20 \text{ gram BB/hr} \rightarrow 1 \text{ Kg BB} = 24 \text{ mg/Kg BB/hari}$  (dengan berat badan mencit 25 gram maka didapatkan dosis 6 mg/25 gram BB/hari)

P2 :  $2769 \text{ mg}/70 \text{ Kg BB/hr} \times 0,0026 = 7,2 \text{ mg}/20 \text{ gram BB/hr} \rightarrow 1 \text{ Kg BB} = 36 \text{ mg/Kg BB/hari}$  (dengan berat badan mencit 25 gram maka didapatkan dosis 9 mg/25 gram BB/hari)

P3 :  $3692 \text{ mg}/70 \text{ Kg BB/hr} \times 0,0026 = 9,6 \text{ mg}/20 \text{ gram/hr} \rightarrow 1 \text{ Kg BB} = 48 \text{ mg/Kg BB/hari}$  (dengan berat badan mencit 25 gram maka didapatkan dosis 12 mg/25 gram BB/hari)

#### **Dosis Ethinyl Estradiol :**

Preparat yang digunakan adalah *Ethinyl Estradiol* dengan dosis konversi untuk mencit akan memperoleh 5,4 µgr. Dimana 1 µgr setara 10 IU. Dan satu vial berisi 30 cc yang mengandung 20.000 IU, maka 0,1 cc setara 66 IU. Dengan menyesuaikan dosis konversi mencit 5,4 µgr setara 54 IU, maka tiap mencit akan mendapatkan 0,095 cc atau dibulatkan 0,1 cc.

#### **Dosis Siklosporin A :**

Siklosporin A dalam sediaan satu ampul berisi 50 mg/ml dengan isi sebesar 5 ml, adapun dosis yang kita butuhkan adalah 10 mg/kg/hari. Dalam hal ini mencit berat berkisar 20-30 gr, maka dosis juga disesuaikan. Sehingga setelah dilakukan penghitungan mencit mendapatkan dosis konversi 1,8 mg/mencit. Sehingga dosis untuk mencit setelah pengenceran dengan *water for injection* 0,2 cc, sandiimun setelah diencerkan disuntikan secara intramuskuler.