

EPINEFRIN

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

TESIS

EFEK PEMBERIAN BERULANG EPINEFRIN DOSIS TERAPEUTIK MAKSIMAL PADA JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT (*Mus Musculus*) BETINA

TKD 18/06

013
2

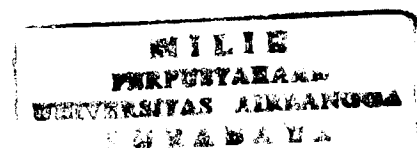


RENI PRIMA GUSTY

NIM 090214767 M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2005



**EFEK PEMBERIAN BERULANG EPINEFRIN DOSIS TERAPEUTIK
MAKSIMAL PADA JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT
(*Mus Musculus*) BETINA**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

RENI PRIMA GUSTY
NIM 090214767 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

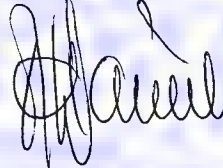
Tanggal 8 Maret 2005

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL , 8 Maret 2005**

Oleh

Pembimbing Ketua



**Tjitra Wardani RW, dr, MS
NIP : 130 676 013**

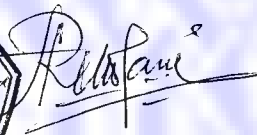
Pembimbing



**Dr. Harjanto JM, dr, AIF
NIP : 130 368 673**

Mengetahui :

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Prof. Retno Handajani, dr, MS, Ph.D
NIP. 130 541 984**

**Telah diuji pada
Tanggal 8 Maret 2005**

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr Paulus Liben,dr,MS

Anggota : Dr Harjanto JM,dr,AIF

Tjitra Wardani RW,dr,MS

Dr Sunarko Setyawan,dr,MS

Dr Elyana Asnar,dr,MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT atas berkat rahmad dan inayahnya sehingga saya dapat menyelesaikan Tesis dengan Judul “Efek Pemberian Berulang Epinefrin Dosis Terapeutik Maksimal Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina”.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Tjitra Wardani RW,dr, MS, selaku Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran dalam penyusunan tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya sampaikan kepada Dr. Harjanto JM, dr, AIF, selaku Pembimbing yang penuh perhatian, dan kesabaran untuk memberikan bimbingan, dan saran dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan Selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr Med. H. Puruhito,dr atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Pendidikan Magister.
2. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, Prof Dr H. Muhammad Amin,dr. SpKP, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Ketua Program Studi S-2 Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar.
4. Ketua Minat Studi Ilmu Faal Choesnan Effendi,dr, AIF, beserta seluruh Dosen yang telah mendidik dan membimbing saya selama mengikuti pendidikan.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Prof Dr Wiyadi,Sp.THT,KTI yang telah memberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar di Unair.

6. Ketua Program Studi Ilmu Keperawatan Prof Dr Eddy Soewandojo, dr, Sp.PD,KTI yang telah memberikan bimbingan dan kesempatan saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister.
7. Wakil Ketua I Program Studi Ilmu Keperawatan Unair Dr Nursalam,MNurs (Hons) yang telah memberi dukungan dan bimbingannya selama saya mengikuti pendidikan Program Magister.
8. Tim Laboratorium Hewan Coba Biokimia Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan membantu proses pengambilan data penelitian untuk diajukan sebagai tesis agar bisa menyelesaikan pendidikan Program Magister.
9. Tim Patologi Anatomi RSUD Soetomo Surabaya yang telah membantu proses pengambilan data sehingga saya bisa menyelesaikan program pendidikan Magister.
10. Teman seangkatan tahun 2002, Mahasiswa Magister Ilmu Kedokteran Dasar Minat Studi Ilmu Faal yaitu Agnes Rahayu,dr ; Anis Rahmawati,drg dan teman sejawat atas segala motivasi, bantuan dan dukungannya selama menempuh pendidikan pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
11. Kedua Orangtua saya yang tercinta, Ayahanda Rusman, BA dan Ibunda Nurhailis,Dra yang tiada henti-hentinya memberikan kasih sayang dan do'a yang tak terhingga walaupun jauh di negeri sebrang.
12. Ketiga adik –adikku tersayang Riri Sriningsih, Riki Prayitno, Rikardi Santosa yang senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program Magister.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini. Harapan saya semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan Ilmu Kedokteran Dasar khususnya dalam pengembangan Ilmu Fisiologi Reproduksi.

Surabaya, 2005

RINGKASAN

EFEK PEMBERIAN EPINEFRIN BERULANG DOSIS TERAPEUTIK MAKSIMAL TERHADAP JUMLAH FOLIKEL OVARIUM MENCIT BETINA (*Mus Musculus*)

Selama kehidupan manusia selalu dapat mengalami stres. Stres merupakan respon tubuh yang spesifik terhadap stimulus atau stresor baik dari internal maupun eksternal. Bila stres berlanjut terus menerus dan berulang dapat memberikan gangguan pada berbagai sistem tubuh, salah satunya adalah sistem reproduksi. Fungsi gonadal axis dapat berubah di bawah kondisi tertentu seperti stresor fisik, bahan kimia, dan psikologis. Stresor ini dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan pada *Hipotalamus-hipofisis-ovarian axis*. Ketidakseimbangan sistem reproduksi yang ditimbulkan dapat berupa gangguan atau supresi ovulasi. Gangguan reproduksi yang terjadi dapat berupa gangguan menstruasi yang meliputi keterlambatan menarche, fase luteal yang singkat dan tidak adekuat, bahkan terjadi amenorrhea sekunder. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya infertil yang reversibel.

Stresor fisik, kimiawi, dan psikologis dapat mempengaruhi frekwensi dan amplitudo pulsatil dari Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). Hal ini penting bagi sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Selain itu stresor juga dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis (pelepasan norepinefrin) dan respon adrenal (pelepasan epinefrin). Peningkatan kadar epinefrin dan norepinefrin dapat meningkatkan pulsasi GnRH. Bila peningkatan pulsasi ini berlebihan dapat menurunkan dan menghentikan sekresi FSH dan LH. Penurunan FSH dan LH akan menghambat pertumbuhan folikel ovarium dan menurunkan sintesis estrogen dan progesteron di dalam ovarium.

Penurunan sintesis estrogen dan progesteron dapat menambah penurunan jumlah folikel ovarium. Epinefrin sebagai salah satu stresor bahan kimia sering digunakan sebagai salah satu terapi, sehingga penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap penurunan jumlah folikel ovarium. Pemberian injeksi subkutan epinefrin dilakukan secara berulang (setiap jam sebanyak 5 kali) yang dimulai pada awal siklus proestrus.

Penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan *Posttest only Control Group Design*. Variabel yang diperiksa adalah jumlah folikel ovarium yang meliputi jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan de graaf. Rancangan analisis data dengan menggunakan analisis *multivariate Anova* dan uji beda nyata kecil (BNT) 5 %.

Analisis terhadap jumlah folikel ovarium dapat digunakan untuk menentukan fertilitas individu. Ovarium yang diambil dibuat preparat histologisnya dan kemudian dilakukan pewarnaan hematoksilin eosin. Dibawah mikroskop dihitung jumlah folikel ovariumnya. Folikel ovarium ini terdiri dari : (1) folikel primer, (2) Folikel sekunder, (3) folikel tersier (4) Folikel De Graaf. Penelitian ini menggunakan 3 kelompok yaitu kelompok kontrol posttest, kelompok 1 yang diberi injeksi subkutan NaCl 0.9 % dan kelompok 2 yang diinjeksi epinefrin.

Berdasarkan hasil analisis statistik deskriptif didapatkan nilai meandan standar deviasi jumlah folikel primer kelompok kontrol *posttest* adalah 18.2 ± 5.71 buah, kelompok yang diinjeksi subkutan NaCl 0,9 % 15.9 ± 3.54 buah, dan kelompok yang diinjeksi epinefrin 14.9 ± 3.45 buah, jumlah folikel sekunder

kelompok kontrol *posttest* 10.3 ± 4.971 buah, kelompok yang diinjeksi subkutan NaCl 0,9 % 9.9 ± 2.47 buah, kelompok yang diinjeksi epinefrin 7.1 ± 4.33 buah, jumlah folikel tersier kelompok kontrol *posttest* 7.8 ± 4.158 buah, kelompok yang diinjeksi subkutan NaCl 0,9 % 4.9 ± 1.79 buah, kelompok yang diinjeksi epinefrin 4.5 ± 1.58 buah, dan jumlah folikel de graaf kelompok kontrol *posttest* 6.1 ± 1.44 buah, kelompok yang diinjeksi subkutan 3.7 ± 1.34 buah, dan kelompok yang diinjeksi epinefrin 1.0 ± 0.82 buah. Analisis *multivariate Anova* jumlah folikel ovarium menunjukkan bahwa pemaparan epinefrin berulang dengan dosis terapeutik maksimal tidak mengakibatkan penurunan pada jumlah folikel primer ($p=0,240$) dan sekunder ($p=0,178$) pada ovarium dengan nilai $p>0,05$. Namun terdapat penurunan jumlah folikel tersier dan de graaf akibat pemaparan epinefrin berulang dengan dosis terapeutik maksimal dengan nilai $p=0,025$ untuk folikel tersier dan $0,000$ untuk folikel de graaf. Analisis uji beda nyata terkecil menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p>0,05$) antara jumlah folikel primer ($p=0,612$), sekunder ($p=0,135$) dan tersier ($p=0,749$) kelompok 1 yang diberi injeksi NaCl 0,9 % dengan kelompok 2 yang diberi injeksi epinefrin. Sedangkan jumlah folikel de graaf antara kelompok 1 dengan 2 menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($p<0,05$) dengan $p=0,000$.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa stresor kimiawi (epinefrin), stresor fisik berupa suntikan subkutan berulang dapat menurunkan jumlah folikel, serta penurunan jumlah folikel de graaf pada ovarium akibat pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal lebih banyak bila dibandingkan dengan pemberian berulang injeksi NaCl 0.9 %. Berdasarkan hasil ini peneliti menyarankan untuk dilakukan penelitian serupa untuk beberapa siklus birahi yang

disertai dengan pengukuran kadar kortisol maupun FSH dan LH untuk melihat pengaruh lebih lanjut terhadap proses folikulogenesis serta membandingkan penurunan jumlah folikel ovarium yang terjadi antara ovarium kanan dan kiri. Selain itu juga dapat melihat pengaruh stres terhadap kadar *growth hormone*, *prolactin*, dan *thyroid stimulating hormone*

ABSTRACT

The aim of the study was to uncover whether epinephrine decrease the amount of female *Mus musculus* ovarian follicle. This study was a laboratory experimental using posttest only control group design. The amount of ovarian follicle comprising primary, secondary, tertiary, and Graafian follicles. Data analysis employed multivariate analysis variance with significance level of $p < 0.05$. The study used 30 female *Mus musculus* aged 2 months. the body weight of 20-30 grams. *Mus musculus* were divided into 3 groups namely whether posttest control group, 0.9 % NaCl hypodermic injection group (first group) and epinephrine injection group with dose 0,001 mg/20 gram (second group). The treatments were given every hours, five times starting from proestrus cycle. Lechery cycle was detemined in ten days pre eliminary study. In experiment, the *mus musculus* were sacrificed at the final cycle of estrus. Histology examination was conducted using Hematoksillin Eosin Staining methode.

The results of normality test revealed that all groups had normal distribution ($p > 0.05$). Homogeneity test on ovarian follicle amount showed homogeneous results ($p > 0.05$). Multivariate analysis variance showed that epinephrine decrease the amount of *Mus musculus* ovarian follicle with Hotelling's trace, $p < 0,05$). BNT showed that epinefrine decrease Graafian follicle ($p < 0,05$)

In conclusion, epinefrin with maximal terapeutic dose in degradation the amount of Graafian follicle.

Key word : *epinephrine, ovarian follicle, Mus musculus*

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------|
| Sampul Depan..... | i |
| Sampul Dalam..... | ii |
| Prasarat Gelar..... | iii |
| Persetujuan..... | iv |
| Penetapan Panitia..... | v |
| Ucapan terima kasih..... | vi |
| Ringkasan..... | viii |
| Abstrak..... | xii |
| DAFTAR ISI..... | xiii |
| DAFTAR TABEL..... | xvi |
| DAFTAR GAMBAR..... | xvii |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xix |
| BAB 1 PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang Masalah..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 4 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 4 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA..... | 5 |
| 2.1 Adrenal..... | 5 |
| 2.2 Medula Adrenal..... | 6 |
| 2.3 Katekolamin..... | 7 |
| 2.4 Biosintesis dan Pelepasan Katekolamin..... | 7 |
| 2.5 Katabolisme Katekolamin..... | 12 |
| 2.6 Efek Epinefrin dan Norepinefrin..... | 14 |
| 2.7 Neuroendokrinologi..... | 17 |
| 2.8 Fisiologi Hipotalamus-Hipofisis- Gonadal Axis..... | 17 |
| 2.9 Hipotalamus dan Sekresi GnRH..... | 21 |
| 2.10 Stres dan Sekresi GnRH | 25 |
| 2.11 Uraian tentang Mencit (<i>Musmusculus</i>)..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 2.12 Anatomi Ovarium pada Mencit..... | 28 |
| 2.13 Siklus Birahi Mencit Betina..... | 30 |
| 2.14 Perkembangan Folikel pada Mencit Betina..... | 34 |
| 2.15 Ovulasi dan Pembentukan Korpus Luteum..... | 42 |
| 2.16 Tes Penentuan Siklus Birahi mencit Betina..... | 43 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..... | 44 |
| 3.1 Kerangka Konseptual..... | 44 |
| 3.2 Hipotesis..... | 46 |
| BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN | 47 |
| 4.1 Rancangan Penelitian..... | 47 |
| 4.2 Populasi, Sampel, Besar sampel, Teknik Pengambilan Sampel..... | 48 |
| 4.2.1 Populasi..... | 48 |
| 4.2.2 Besar sampel..... | 48 |
| 4.2.3 Teknik pengambilan sampel..... | 49 |
| 4.3 Variabel Penelitian..... | 49 |
| 4.3.1 Variabel bebas..... | 49 |
| 4.3.2 Variabel tergantung..... | 49 |
| 4.3.3 Variabel kendali..... | 50 |
| 4.4 Definisi Operasional..... | 50 |
| 4.4.1 Waktu perlakuan..... | 50 |
| 4.4.2 Dosis epinefrin..... | 50 |
| 4.4.3 Jumlah folikel ovarium..... | 51 |
| 4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian..... | 52 |
| 4.5.1 Bahan penelitian..... | 52 |
| 4.5.2 Instrumen penelitian..... | 52 |
| 4.6 Prosedur Penelitian..... | 53 |
| 4.6.1 Aklimatisasi..... | 53 |
| 4.6.2 Pembagian kelompok..... | 53 |
| 4.6.3 Penimbangan berat badan..... | 53 |
| 4.6.4 Pemeriksaan siklus birahi..... | 54 |
| 4.6.5 Pembiusan..... | 55 |
| 4.6.7 Pembedahan..... | 55 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.6.8 | Pengamatan..... | 55 |
| 4.7 | Lokasi dan Waktu Penelitian..... | 57 |
| 4.8 | Teknik Analisis Data..... | 57 |
| BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN..... | | 58 |
| 5.1 | Data Penelitian..... | 58 |
| 5.1.1 | Deskripsi rata-rata dan standar deviasi jumlah folikel ovarium..... | 58 |
| 5.1.2 | Uji normalitas..... | 58 |
| 5.1.3 | Uji homogenitas..... | 59 |
| 5.1.4 | Uji manova..... | 60 |
| 5.1.5 | Uji beda nyata terkecil/BNT..... | 61 |
| 5.2 | Analisis dan Hasil Penelitian..... | 62 |
| 5.2.1 | Jumlah folikel primer..... | 63 |
| 5.2.2 | Jumlah folikel sekunder..... | 63 |
| 5.2.3 | Jumlah folikel tersier..... | 64 |
| 5.2.4 | Jumlah folikel de graaf..... | 65 |
| BAB 6 PEMBAHASAN..... | | 69 |
| 6.1 | Pemberian Injeksi NaCl 0,9 % pada Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina..... | 69 |
| 6.2 | Pemberian Injeksi Epinefrin Dosis Terapeutik Maksimal pada Jumlah Folikel Ovarium Mencit betina..... | 71 |
| 6.3 | Perbandingan Pemberian Injeksi Epinefrin Dosis Terapeutik Maksimal dan Pemberian Injeksi Berulang NaCl 0.9 % terhadap Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina..... | 73 |
| BAB 7 PENUTUP..... | | 75 |
| 7.1 | Kesimpulan..... | 75 |
| 7.2 | Saran..... | 76 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | | 77 |
| LAMPIRAN..... | | 81 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 5.1 Deskripsi rerata dan standar deviasi jumlah folikel ovarium mencit betina | 58 |
| Tabel 5.2 Uji kolmogorov-smirnov Z data ovarium Mencit Betina | 59 |
| Tabel 5.3 Tes <i>levene</i> ovarium mencit betina..... | 60 |
| Tabel 5.4 Uji manova ovarium mencit betina..... | 61 |
| Tabel 5.5 Uji anova ovarium mencit betina..... | 61 |
| Tabel 5.6 Uji BNT folikel ovarium mencit betina..... | 62 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1 Anatomi adrenal..... | 5 |
| Gambar 2.2 Biosintesis katekolamin..... | 9 |
| Gambar 2.3 Pengaturan biosintesis katekolamin di medula adrenal..... | 10 |
| Gambar 2.4 Katabolisme epinefrin dan norepinefrin yang bersirkulasi..... | 13 |
| Gambar 2.5 Mekanisme kerja epinefrin pada sel target dengan reseptor α_1 , α_2 , β adrenergik..... | 15 |
| Gambar 2.6 Pelepasan hormon seks wanita..... | 20 |
| Gambar 2.7 Hubungan sistem saraf dengan sistem endokrin..... | 21 |
| Gambar 2.8 Kadar hormon pada siklus menstruasi | 24 |
| Gambar 2.9 Struktur anatomi mikroskopis korteks ovarium pada mencit betina..... | 29 |
| Gambar 2.10 Hapusan mukosa vagina yang memperlihatkan siklus birahi..... | 34 |
| Gambar 2.11 Tahap perkembangan folikel ovarium..... | 36 |
| Gambar 2.12 Folikel primer ovarium..... | 37 |
| Gambar 2.13 Folikel sekunder ovarium..... | 38 |
| Gambar 2.14 Folikel tersier ovarium..... | 39 |
| Gambar 2.15 Folikel de graaf ovarium..... | 40 |
| Gambar 2.16 Folikel ovarium yang atresia..... | 41 |
| Gambar 2.17 Gambaran tipikal dari smear dari beberapa tahapan pada siklus birahi tikus betina..... | 43 |
| Gambar 5.1 Irisan melintang ovarium mencit kelompok kontrol dengan perbesaran 40 x..... | 66 |
| Gambar 5.2 Irisan melintang ovarium mencit kelompok kontrol dengan perbesaran 400 X..... | 66 |
| Gambar 5.3 Irisan melintang ovarium mencit kelompok injeksi NaCl 0.9 % dengan perbesaran 40 X..... | 67 |
| Gambar 5.4 Irisan melintang ovarium mencit kelompok injeksi NaCl 0.9 % dengan perbesaran 400x..... | 67 |

Gambar 5.5 Irisan melintang ovarium mencit kelompok injeksi epinefrin dengan perbesaran 40 X..... 68

Gambar 5.5 Irisan melintang ovarium mencit kelompok injeksi epinefrin dengan perbesaran 40 x..... 68



DAFTAR SINGKATAN

| | | |
|------|---|--|
| E | = | Epinefrin |
| NE | = | Norepinefrin |
| FSH | = | Follicle Stimulating Hormone |
| LH | = | Luteinizing Hormone |
| GnRH | = | Gonadotropin Releasing Hormone |
| ATP | = | Adenosintriphospat |
| PNMT | = | Phenylethanol-amin-N-methyltransferase |
| Ach | = | Asetilkolin |
| Mg | = | Magnesium |
| Na | = | Natrium |
| Ca | = | Kalsium |
| DOPA | = | Dihydroxyphenylalanine |
| DBH | = | Dopamin - β - hydroxylase |
| AAAD | = | Aromatic-L-amino acid |
| VMA | = | Asam vanillylmandelik, |
| MAO | = | Monoamin oksidase |
| COMT | = | Katekol - O - metiltransferase |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|---------|
| Lampiran 1. Perhitungan dosis epinefrin..... | 81 |
| Lampiran 2. Pembuatan Preparat Histologis Ovarium..... | 82 |
| Lampiran 3. Tabel konversi perhitungan dosis untuk beberapa jenis hewan dan manusia..... | 86 |
| Lampiran 4. Tabel volume maksimal yang dapat diberikan pada beberapa hewan spesies hewan..... | 87 |
| Lampiran 5. Jadwal Penelitian..... | 88 |
| Lampiran 6. Skema Pelaksanaan Penelitian..... | 89 |
| Lampiran 7. Pakan Hewan Coba..... | 90 |
| Lampiran 8. Data Penelitian..... | 91 |
| Lampiran 9. Analisis Uji Normalitas..... | 92 |
| Lampiran 10. Analisis Uji Homogenitas..... | 93 |
| Lampiran 11 Analisis Uji Manova..... | 94 |
| Lampiran 12. Analisis Uji Beda Nyata Kecil..... | 96 |

BAB 1

PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari, setiap individu dapat mengalami stres. Stres didefinisikan sebagai respon non spesifik dari organisme (Selye, 1956), disamping itu stres juga dapat didefinisikan sebagai respon tubuh terhadap stimulus baik eksternal maupun internal yang dikenal *fight or flight response* (Vander, 2001), sedangkan stimuli yang dapat menimbulkan respon tubuh disebut stresor (Ganong, 2001). Stresor baik fisik, kimia, dan psikologis dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis dan respon adrenal (Edward, 1993). Aktivasi sistem saraf simpatis oleh stresor dapat menyebabkan pelepasan neurotransmitter norepinefrin (NE) lokal pada ujung saraf simpatis postganglionik, sedang aktivasi stresor pada medula adrenal adalah merangsang lepasnya epinefrin (E) ke dalam sirkulasi (Norman, 1987). Epinefrin mempunyai sifat yang unik yaitu memodulasi sejumlah NE, dimana NE yang dilepaskan akan diduplikasi dan dikuatkan oleh E yang mencapai tempat yang sama melalui sirkulasi (Cunningham, 2002; Ganong, 2001). Selain meningkatkan kadar E, NE, dan dopamin, stresor juga dapat meningkatkan kadar kortikosteroid (Chiueh dan McCarty, 1981; De Boer, 1990). Perbedaan jenis stresor dapat meningkatkan respon endokrin yang berbeda pada berbagai intensitas yang berbeda. Variasi respon spesies terhadap stresor dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu : usia, jenis kelamin, dan kondisi spesies tersebut (Griffin, 1989). Disamping itu variasi respon juga dapat dipengaruhi oleh waktu, baik secara akut maupun kronik (Chiueh dan McCarty, 1981; De Boer, 1990).

Peningkatan kadar E dan atau NE dapat meningkatkan pulsasi hipotalamus. Peningkatan pulsasi ini dapat merangsang lepasnya *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) dari hipotalamus ke sistem portal menuju ke hipofisis anterior (Speroff, 1994). Adanya peningkatan GnRH akan merangsang lepasnya 2 macam *gonadotropin* dari hipofisis anterior yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), dimana LH lebih sensitif terhadap perubahan kadar GnRH (Greenspan, 1997; Guyton, 2000; Speroff, 1994). FSH dan LH sama-sama bertanggung jawab pada proses pematangan folikel. Pada fase folikuler, FSH dan LH merangsang pembentukan hormon steroid estrogen dan progesteron di dalam ovarium. Hormon ini akan memberikan umpan balik positif maupun negatif pada sekresi FSH dan LH dari hipofisis anterior (Speroff, 1994; Ganong, 2001).

Secara normal GnRH disekresi dalam pulsasi yang episodik. Hal ini penting bagi sekresi normal FSH dan LH (Ganong, 2001). Pada berbagai penelitian dapat ditunjukkan bahwa perubahan sekresi FSH dan LH memerlukan pengeluaran GnRH secara pulsatil dengan frekuensi dan amplitudo dalam batas kritis (Speroff, 1994). Akan tetapi bila amplitudo dan frekuensi pulsasi GnRH ditingkatkan secara berlebihan dapat menurunkan dan menghentikan sekresi dari *gonadotropin*. Hal ini telah dibuktikan dengan penelitian pada kera yang diberi 1 mikrogram GnRH per menit untuk 6 menit setiap jamnya (1 pulsasi per jam) menghasilkan konsentrasi di dalam darah portal kurang lebih sama dengan puncak konsentrasi GnRH dalam darah portal manusia ± 2 mikrogram/ml. Kenaikan frekuensi pulsasi GnRH menjadi 2 dan 5 pulsasi perjam akan menghentikan sekresi *gonadotropin*. Sekresi *gonadotropin* juga akan turun bila dosis GnRH

dinaikkan. Peningkatan pulsasi GnRH akan merangsang peningkatan konsentrasi LH dan FSH. Peningkatan ini akan memicu terjadinya pengaturan ke bawah (*down regulation*) sehingga dapat memicu terjadinya proses internalisasi yang berarti hilangnya reseptor dari membran dan berkurangnya fungsi secara biologis (Speroff, 1994). Disamping itu bila GnRH diberikan dengan infus tetap maka reseptor GnRH dalam hipofisis anterior meregulasi ke bawah dan sekresi LH turun ke nol, tetapi bila GnRH diberi secara episodik maka sekresi LH dirangsang (Ganong, 2001).

Menurut Yatim (1994), fase folikuler awal (proestrus dan estrus) merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pertumbuhan folikel oleh rangsangan FSH. Folikel yang sudah tumbuh akan menghasilkan cairan folikel yang mengandung hormon estrogen yang lebih banyak. Hormon estrogen inilah yang akan mempengaruhi suplai darah ke organ reproduksi dan meningkatkan pertumbuhan folikel. Bila terjadi penurunan kadar FSH dan LH maka sintesis hormon estrogen dan progesteron di dalam ovarium akan menurun. Penurunan FSH dan LH akan menyebabkan penurunan pertumbuhan folikel ovarium pada fase folikuler awal (Speroff, 1994; Greenspan, 1997; Guyton, 2000).

Sejauh ini belum ada penelitian yang secara jelas melaporkan apakah pemberian epinefrin dapat menurunkan jumlah folikel ovarium. Berdasarkan fenomena tersebut penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana pengaruh pemberian E dosis terapeutik maksimal dapat menurunkan jumlah folikel ovarium.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas maka rumusan permasalahannya adalah :

Apakah pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal pada fase proestrus dapat menurunkan jumlah folikel ovarium (primer, sekunder, tersier dan de Graaf) mencit betina ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal dapat menekan proses folikulogenesis.

1.3.2 Tujuan khusus

Membuktikan efek pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal pada fase proestrus dapat menurunkan jumlah folikel ovarium (folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf) mencit betina.

1.4 Manfaat penelitian

Dengan adanya penelitian ini dapat memberikan gambaran :

Efek stresor pada folikulogenesis

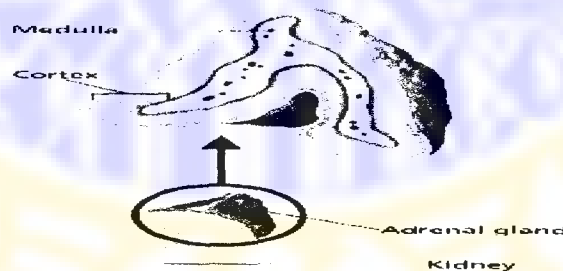
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Pada bab ini akan diuraikan tentang adrenal, medula adrenal, struktur dan fungsi hormon medula : biosintesis, pelepasan dan katabolisme katekolamin, efek epinefrin dan norepinefrin, neuroendokrin meliputi sirkulasi portal hipotalamus-hipofisis, hipotalamus-hipofisis-gonadal axis, stres dan sekresi GnRH, reproduksi mencit betina meliputi anatomi reproduksi mencit betina, siklus birahi, pemeriksaan siklus birahi, perkembangan folikel, ovulasi dan pembentukan korpus luteum.

2.1 Adrenal

Dalam glandula adrenal terdapat 2 organ endokrin yaitu korteks adrenal dan medula adrenal *gambar 2.1*. Medula adrenal membentuk 28 % masa glandula adrenal. Sekresi utama medula adrenal (bagian dalam) ini adalah katekolamin epinefrin, norepinefrin dan dopamin sedangkan korteks adrenal (bagian luar) mensekresi hormon steroid yaitu glukokortikoid dan mineralokortikoid. Disamping itu korteks adrenal juga menghasilkan hormon seks (androgen) yang menimbulkan efek ringan pada fungsi reproduksi (Ganong,2001; Fox,1999).



Gambar 2.1. Anatomi adrenal (Ganong, 2001)

2.2 Medula Adrenal

Medula adrenal dibentuk oleh pita saling menjalin dari sel yang mengandung granula padat yang dipersarafi dan berbatas dengan sinus venosus. Medula adrenal merupakan sumber dari katekolamin sirkuler. Medula adrenal mempunyai 2 jenis sel yang dapat dibedakan secara morfologi : (1) Satu jenis sel yang mensekresi epinefrin (E) mempunyai granula lebih besar, (2) Sel yang mensekresi norepinefrin (NE) mempunyai granula lebih kecil. Pada manusia 90 % sel adalah pensekresi norepinefrin sedangkan jenis sel yang mensekresi dopamin tidak diketahui. NE berperan sebagai neurotransmitter bila berada pada lokal, dan di sirkulasi berperan sebagai hormon seperti halnya dopamin (Ganong, 2001; Vander, 2001).

Hormon kelenjar adrenal sangat penting untuk adaptasi terhadap kondisi lingkungan seperti : stres. Efek stimulasi medula adrenal terjadi pada aktivitas jantung disampaikan oleh Oliver & Schafer (1894). Hormon utama medula adrenal adalah epinefrin yang menjadi hormon 1 yang diisolasi oleh Abel (1894). Pada penelitian ini diketahui bahwa sel medula adrenal sama dengan sel postganglionik sistem saraf simpatis, terakhir diketahui bahwa katekolamin lain norepinefrin adalah neurotransmitter sistem saraf simpatis. Epinefrin dan norepinefrin dilepaskan ketika preganglionik serabut saraf medula adrenal distimulasi (Cunningham, 2002).

Pada orang dewasa, medula adrenal memiliki berat \pm 1 gram dan terdiri dari sel-sel *chromaffin*. Pada sel-sel *chromaffin* terdapat granula-granula dengan penampang 100-300 nm (seperti ditemukan pada postganglionik ujung saraf simpatis). Granula-granula ini berisi katekolamin, yaitu epinefrin dan

norepinefrin (20% dari berat), *adenotriphospat* (ATP) dan nukleotida lain (15 %), protein (35 %), dan lipid (20 %) (Ganong, 2001).

Beberapa aktivitas neurotransmitter NE yang dilepaskan lokal pada *efektor site* ujung saraf simpatis postganglionik, diduplikasi dan dikuatkan oleh hormon E yang mencapai tempat yang sama melalui sirkulasi. Bagaimanapun E sendiri mempunyai efek unik yaitu memodulasi sejumlah NE. Lebih jauh, di bawah kondisi tertentu, misalnya selama hipoglikemi, medula adrenal diaktivasi (Ganong, 2001; Cunningham, 2002).

2.3 Katekolamin

Norepinefrin, epinefrin dan dopamin disekresi oleh medula adrenal. Kucing dan sejumlah spesies lain terutama mensekresi norepinefrin tetapi anjing dan manusia kebanyakan mengeluarkan katekolamin epinefrin ke dalam vena adrenal. Norepinefrin yang masuk ke sirkulasi berasal dari ujung saraf noradrenergik (Ganong, 2001).

2.4 Biosintesis dan Pelepasan Katekolamin

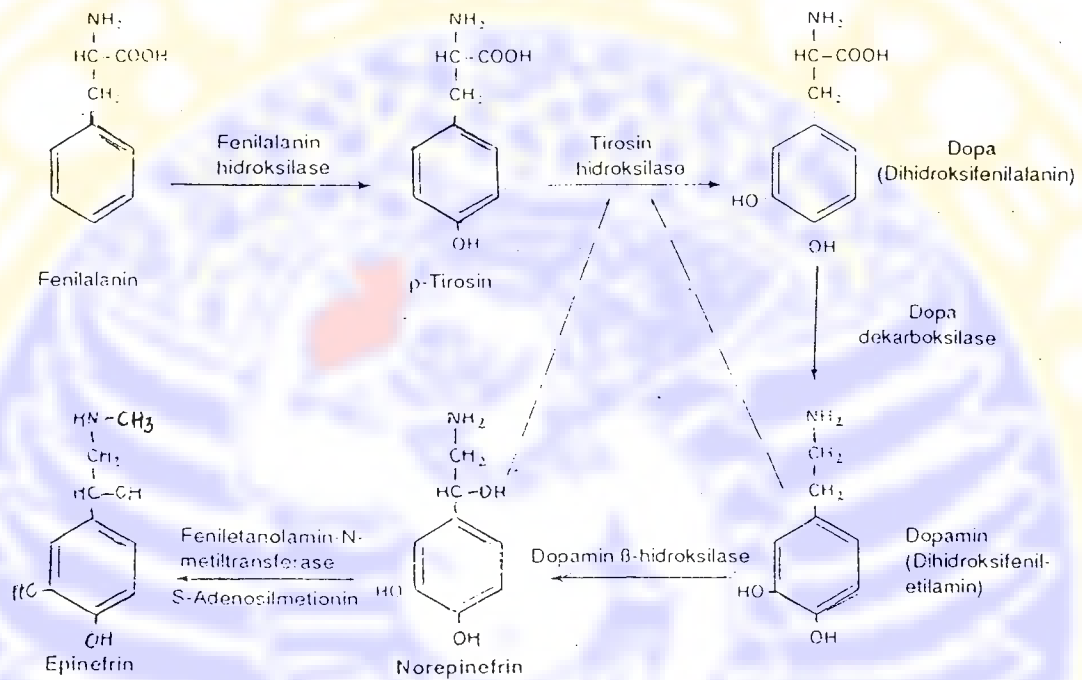
Struktur epinefrin, norepinefrin dan dopamin beserta alur biosintesis dan metabolismenya diperlihatkan pada *gambar 2.2 & 2.3*. Gambar tersebut menjelaskan bahwa norepinefrin dibentuk oleh hidroksilasi dan dekarboksilasi tirosin, sedangkan epinefrin oleh metilasi norepinefrin. Katekolamin utama yang ditemukan di dalam tubuh adalah norepinefrin, epinefrin dan dopamin yang dibentuk oleh hidroksilasi dan dekarboksilasi asam amino fenilalanin dan tirosin. Fenilalanin hidroksilase terutama ditemukan di dalam hati. Tirosin diangkut ke

dalam neuron pensекреksi katekolamin dan sel medula adrenal oleh mekanisme pemekatan. Tirosin diubah ke dopa dan kemudian ke dopamin di dalam sitoplasma sel oleh tirosin hidroksilase dan dopa dekarboksilase. Dekarboksilase disebut juga dengan L-asam amino aromatik dekarboksilase yang mirip dengan 5-hidroksitriptofan dekarboksilase, tetapi tidak identik. Dopamin kemudian masuk ke vesikel bergranulasi, di dalam ini terjadi perubahan dopamin menjadi norepinefrin oleh dopamin - β hidroksilase (Ganong, 2001; Cunningham, 2002; Norman, 1987).

Dopamin hidroksilase hanya terdapat pada granula. Dengan adanya molekul oksigen dan hidrogen donor, enzim ini akan mengkatalis pembentukan NE dari dopamin. Saat istirahat NE berdifusi kembali ke sitoplasma. N-metilasi dilakukan oleh PNMT dengan menggunakan 5-adenosylmethione sebagai metil donor. Epinefrin yang terbentuk selanjutnya masuk kembali ke dalam granula *chromaffin*, tempat penyimpanan E sebagai hormon medula adrenal dominan. *Uptake* dopamin, NE, dan E oleh granula sekretorik merupakan transpor aktif yang membutuhkan ATP dan Mg. Hormon katekolamin yang disimpan dalam granula pada konsentrasi tinggi juga memerlukan ATP. Sekresi NE diinisiasi oleh asetilkolin (Ach) yang dilepaskan dari neuron preganglionik yang menginervasi sel-sel sekretorik. Ach menyebabkan saluran kation (Na^+ dan Ca^{2+}) terbuka, sehingga Ca^{2+} ekstrasel masuk yang memicu terjadinya eksositosis (Ganong, 2001; Norman, 1987).

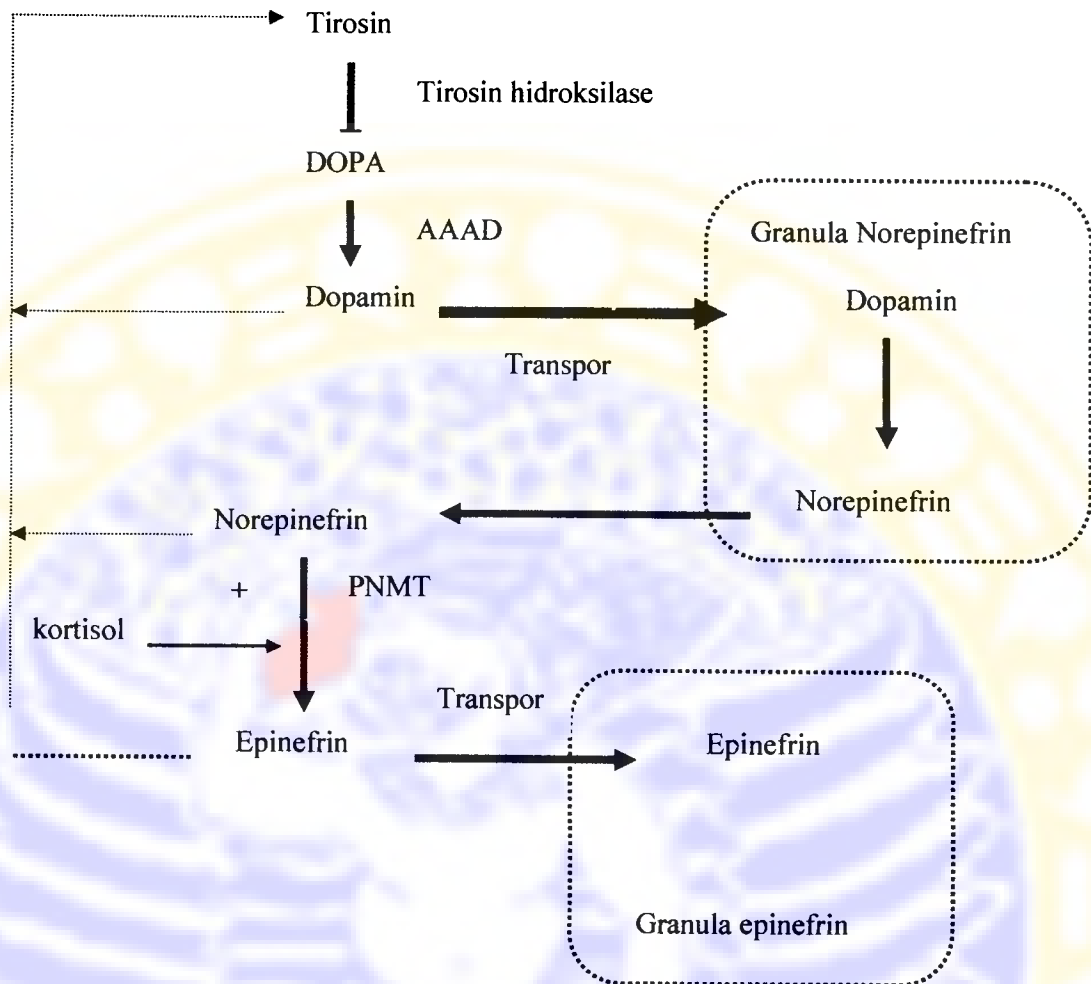
Tirosin hidroksilase yang mengkatalis tahap ini merupakan sasaran inhibisi umpan balik oleh dopamin dan norepinefrin, sehingga memberi kontrol internal bagi proses sintesis. Kofaktor bagi tirosin hidroksilase merupakan

tetrahydrobiopterin yang diubah ke dihydrobiopterin bila tirosin diubah ke dopa (Ganong, 2001; Guyton, 2000).



Gambar 2.2. Biosintesis katekolamin. Garis terputus menunjukkan inhibisi tirosin hidroksilase oleh norepinefrin dan dopamin. Tetrahydrobiopterin suatu kofaktor bagi kerja fenilalanin hidroksilase dan tirosin hidroksilase (Ganong, 2001)

Produk akhir dari metabolisme tirosin ini adalah dopa, dopamin, norepinefrin, epinefrin yang menghambat kerja enzim tirosin hidroksilase dalam gambar 3 (Cunningham, 2002).



Gambar 2.3. Pengaturan biosintesis katekolamin di medula adrenal. Tanda + mengindikasikan stimulasi dan panah putus-putus menandakan inhibisi. AAAD : aromatic-L-amino acid; DBH : Dopamin - β - hydroxylase; DOPA : dihydroxyphenylalanine; PNMT : Phenylethanol-amin-N-methyltransferase (Hedge GA.Colby HD, Goodman RL,1987)

Beberapa neuron dan sel medula adrenal juga mengandung enzim sitoplasma Peniletanolamin-N- Metiltransferase (PNMT) yang mengkatalisis konversi norepinefrin ke epinefrin. Dalam sel ini, norepinefrin jelas meninggalkan vesikel, diubah ke epinefrin dan kemudian memasuki vesikel penyimpanan lain. PNMT ini ditemukan dalam jumlah lumayan hanya di dalam otak dan medula adrenal. PNMT medula adrenal diinduksi oleh glukokortikoid

walaupun relatif besar jumlah yang diperlukan. Konsentrasi glukokortikoid di dalam darah akan tinggi yang didrainase dari korteks adrenal. Setelah hipofisektomi, konsentrasi glukokortikoid darah ini turun dan sintesis epinefrin menurun (Ganong, 2001; Cunningham, 2002).

Di dalam vesikel bergranulasi, norepinefrin dan epinefrin terikat ke ATP dan berhubungan dengan protein yang dinamai kromogranin yang fungsinya tidak diketahui. Di dalam plasma sekitar 95 % dopamin serta 70 % norepinefrin dan epinefrin dikonjugasikan ke sulfat. Sulfat konjugasi tidak aktif dan fungsi belum diketahui. Manusia yang berbaring, kadar normal norepinefrin plasma sekitar 300pg/ml (1,8nmol/L). Ada peningkatan 50-100 % sewaktu berdiri. Norepinefrin plasma umumnya tidak berubah setelah adrelektomi, tetapi kadar epinefrin bebas yang normalnya sekitar 30 pg/ml (0,16 nmol/L) turun pada kadar nol. Epinefrin yang ditemukan dalam jaringan selain medula adrenal dan otak sebagian besar diserap dari aliran darah daripada disintesis di tempatnya.

Kadar dopamin bebas plasma selular 35 pg/ml (0,23 nmol/L) dan ada dopamin dalam jumlah lumayan di dalam urin. Setengah dopamin plasma berasal dari medula adrenal sedangkan setengah sisanya berasal dari ganglia simpatis atau komponen lain susunan saraf autonom.

Katekolamin mempunyai waktu paruh sekitar 20 menit di dalam sirkulasi. Bagi kebanyakan bagian, katekolamin dimetoksilasi dan kemudian dioksidasi ke asam 3-metoksi-4 hidrosimandelat (asam vanillylmandelik, VMA). Sekitar 50 % katekolamin yang disekresi muncul di dalam urin sebagai metanefrin dan nometanefrin bebas atau dikonyugasi serta 35 % sebagai VMA. Hanya

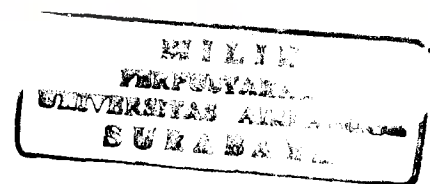
sejumlah kecil norepinefrin dan epinefrin bebas diekskresikan 6 mikrogram epinefrin dan 700 mikrogram VMA diekskresikan perhari (Ganong, 2001).

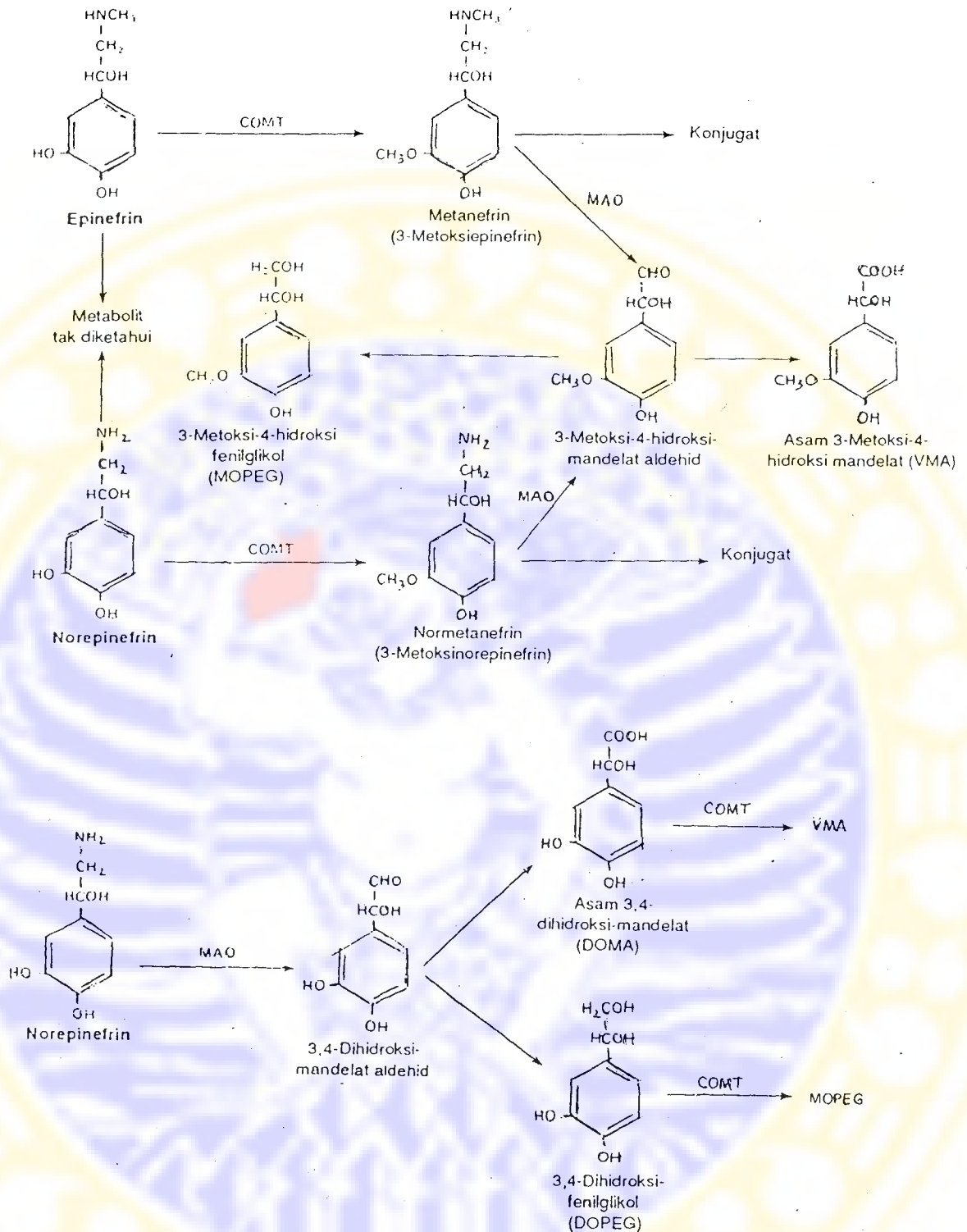
Katekolamin ditahan di dalam vesikel bergranulasi oleh sistem transport aktif. Katekolamin dilepaskan dari neuron autonom dan sel medula adrenal oleh eksositosis karena katekolamin ada di dalam vesikel bergranulasi, maka ATP dan dopamin - β hidrosilase yang tidak terikat membran dilepaskan bersama NE dan E (Ganong, 2001).

2.5 Katabolisme Katekolamin

Epinefrin dan norepinefrin dimetabolisme ke produk tidak aktif secara biologi oleh oksidasi dan metilasi. Reaksi pertama dikatalisis oleh monoamin oksidase (MAO) dan yang terakhir oleh katekol - O - metiltransferase (COMT) *gambar 4*. MAO terletak di permukaan luar mitokondria. Ia terdistribusi luas, terutama banyak dalam ujung saraf tempat katekolamin disekresikan COMT yang terdistribusi luas, dengan konsentrasi tinggi di dalam hati dan ginjal, tetapi ia tidak dapat ditemukan di dalam ujung saraf (Ganong, 2001; Norman, 1987).

Epinefrin dan norepinefrin bersirkulasi bagi kebanyakan bagian O-metilasi dan pengukuran turunan metilasi normetanefrin dan metanefrin di dalam urin merupakan suatu indeks yang baik bagi kecepatan sekresi norepinefrin dan epinefrin. Jalur efektor yang mengaktivasi medula adrenal pada umumnya terdiri dari serabut preganglionik kolinergik pada saraf splanknik yang lebih besar. Dengan adanya rangsangan, Ach dilepaskan dari ujung saraf. Neurotransmitter ini mengakibatkan depolarisasi membran sel *chromaffin* melalui peningkatan permeabilitas Na^+ .





Gambar 2.4 : Atas : Katabolisme epinefrin dan norepinefrin yang bersirkulasi. Tempat utama katabolisme di hati. Konjugatnya terutama glukoronida dan sulfat. MOPEG juga dikonjugasi. Bawah : kemudian bisa di -O- metilasi ke VMA dan MOPEG, epinefrin dalam ujung saraf mungkin dikatabolis dalam cara yang sama, MAO, monoamina oksidase; COMT, katekol-O-metiltransferase (Ganong, 2001)

Hal ini kembali menginduksi influks Ca^{2+} sehingga merangsang granula sekretorik. E, NE, ATP, enzim dopamin β hidroksilase, opiat peptides, chromagranin, yang merupakan isi granula semuanya dilepaskan ke sirkulasi.

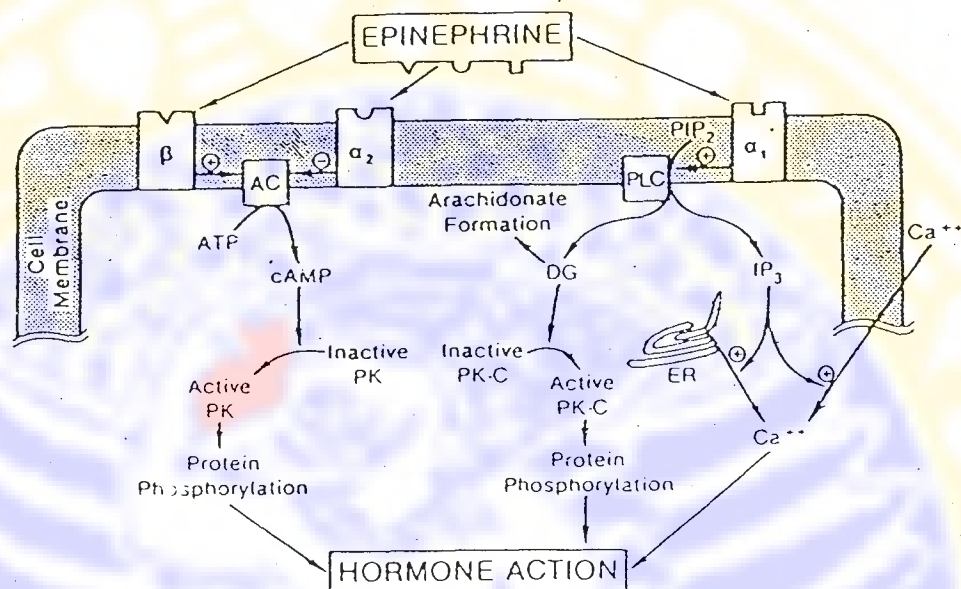
Di dalam tubuh bila terjadi peningkatan epinefrin (E) maka norepinefrin (NE) yang berada di dalam granula akan bergerak keluar ke sitosol. NE yang berada di sitosol berubah menjadi E dengan bantuan enzim PNMT (Phenylethanol-amin-N-methyltransferase). E kemudian bergerak masuk ke granula E untuk disimpan sebelum dilepaskan kembali (Cunningham, 2002).

2.6 Efek Epinefrin dan Norepinefrin

Disamping mempunyai efek pelepasan saraf noradrenergik, norepinefrin dan epinefrin merangsang susunan saraf dan menimbulkan efek metabolik yang mencakup glikogenolisis di dalam hati dan otot rangka, mobilisasi FFA, peningkatan laktat plasma dan merangsang laju metabolik

Aktivasi E dan NE adalah melalui reseptor yang terdapat pada membran plasma, yaitu α_1 , α_2 , β_1 dan β_2 . Aktivitas E tampak lebih nyata bila berikatan dengan reseptor β_1 dan β_2 menjadi lemah bila berikatan dengan reseptor α . Sebaliknya NE, aktivitasnya dominan bila mengikat β_1 dan lemah pada β_2 . Reseptor β_1 , β_2 dan α_2 memiliki struktur yang sama yaitu glikoprotein tunggal dengan BM ± 64.000 . Reseptor α_1 berbeda dengan lainnya, BM 80.000. Reseptor β_1 dan β_2 terangkai dengan merangsang *adenyil siklase*, sehingga cAMP yang berperan sebagai *second messenger* untuk memberi efek biologi. Sedangkan reseptor α_2 menghambat G protein, sehingga terjadi penurunan kadar

cAMP dan aktivitas PK A (Phosphokinase A). Reseptor α_1 akan berikatan dengan fosfatidylinositol, PK C bersama dengan Ca^{2+} memediasi efek hormon ini (Cunningham, 2002). Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.5



Gambar 2.5. Mekanisme kerja epinefrin pada sel target dengan reseptor α_1 , α_2 , β adrenergik (Cunningham, 2002)

Efek norepinefrin (NE) dan epinefrin (E) ditimbulkan oleh kerja atas 2 kelas reseptor yaitu reseptor α dan β -adrenergik. NE dan E meningkatkan kecepatan kontraksi jantung. Epinefrin dan norepinefrin sama kuat, walaupun dalam E manusia biasanya membangkitkan lebih banyak ansietas dan ketakutan.

Reseptor α mengontrol pelepasan katekolamin dari akhir saraf simpatis. Reseptor α_1 mempengaruhi akhir saraf *postsynaptic* dan reseptor α_2 mempengaruhi *presynaptic* terminal. Reseptor β_1 mempengaruhi jantung dan reseptor β_2 mempengaruhi kontraksi otot polos dan metabolisme intermedier.

Efek metabolik katekolamin dimediasi terutama oleh reseptor β_2 karena ikatan epinefrin 10 kali lebih kuat dari NE, dengan reseptor β_2 ini epinefrin lebih peran dari pada NE dalam mengontrol metabolisme (Cunningham, 2002).

Bila seekor binatang/hewan atau manusia terpapar ke satu dari banyak rangsangan berbahaya atau mungkin berbahaya, maka ada peningkatan sekresi ACTH dan akibatnya kadar glukokortikoid yang bersirkulasi meningkat. Kebanyakan rangsangan stres dapat meningkatkan sekresi ACTH juga mengaktifasi sistem simpatomedula adrenal dan bagian fungsi glukokortikoid yang bersirkulasi (Ganong, 2001).

2.7 Neuroendokrinologi

Terdapat dua bagian besar otak yang mempunyai peranan penting untuk mengatur fungsi reproduksi. Hipotalamus dan kelenjar hipofisis. Pada masa yang lalu hipofisis dianggap sebagai kelenjar utama. Kemudian timbul pendapat baru yang berpendapat bahwa hipofisis hanyalah berperan sebagai salah satu di bawah hipotalamus yang berperan sebagai konduktor, menjawab rangsangan yang berasal baik dari perifer, maupun dari sistem saraf sentral, dan jawaban tersebut dibawa oleh neurotransmitter ke hipofisis melalui jaringan pembuluh portal. Perkembangan lebih lanjut dikenal dengan siklus menstruasi, dikendalikan oleh steroid seks yang dihasilkan di dalam folikel yang akan mengalami ovulasi. Hipotalamus dan pengaruhnya adalah mutlak untuk jalannya seluruh mekanisme, tetapi fungsi endokrin yang menentukan ovulasi. Hipotalamus dan pengaruhnya adalah mutlak untuk jalannya seluruh mekanisme, tetapi fungsi endokrin yang menentukan ovulasi adalah steroid yang mengadakan hubungan umpan balik dengan hipofisis anterior (Speroff, 1994).

2.8 Fisiologi Hipotalamus-Hipofisis-Gonadal Axis

Otak dalam mempengaruhi kelenjar hipofisis anterior, memerlukan transmisi atau hubungan. Hubungan saraf secara langsung tidak ada. Peredaran darah yang banyak terdapat pada daerah median eminens hipotalamus. Arah aliran darah pada sirkulasi portal hipofisis dari otak ke hipofisis (Speroff, 1994).

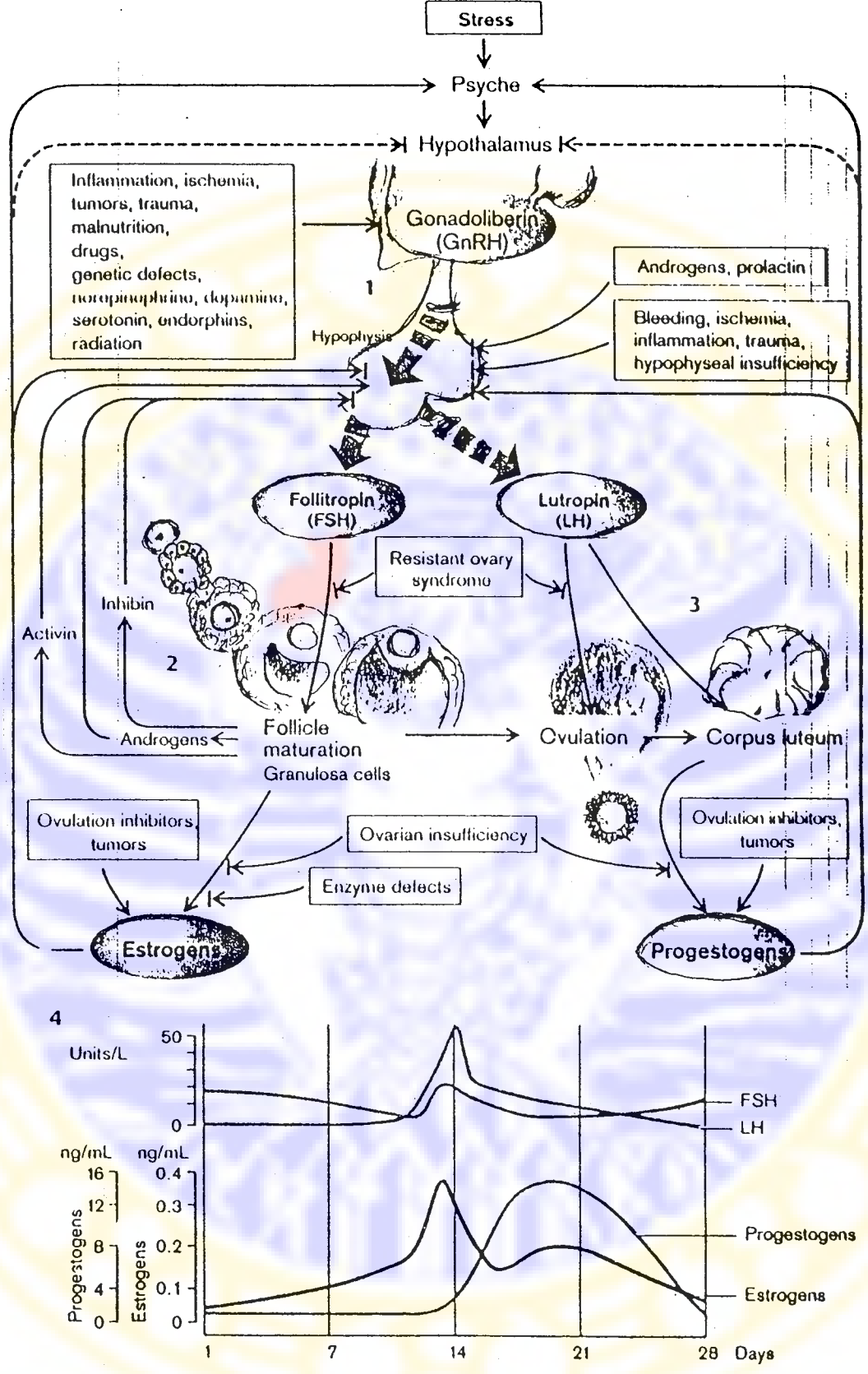
Neuroendokrin hipotalamus bersifat merangsang (positif) pada hormon pertumbuhan (*Growth Hormone*), *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH). *Adenocorticotropin hormone* (ACTH) juga merupakan sebagian dari

neurohormon hipotalamus. Neurohormon yang mengatur gonadotropin disebut *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). GnRH murni atau sintesis dapat merangsang sekresi baik FSH maupun LH. Satu GnRH dapat merangsang dua macam gonadotropin, FSH dan LH karena adanya pengaruh lingkungan hormonal yang berbeda, terutama efek umpan balik steroid pada kelenjar hipofisis (Greenspan, 1997; Guyton, 2000). Hormon *gonadotropin* FSH dan LH dilepaskan oleh hipofisis anterior secara pulsatif (setiap 60-90 untuk 1 menit) setelah adanya stimulasi pulsasi GnRH dari hipotalamus pada frekuensi yang sama (Stefan; Florian, 2000). Hormon FSH dan LH ini dibentuk oleh sel yang sama di hipofisis anterior yang terdiri dari 5-10 % sel (Predergast, 2002). Sukra,dkk (1989) menambahkan bahwa FSH dihasilkan oleh sel-sel basofil dari kelenjar hipofisis anterior yang menyebabkan folikel tumbuh, sehingga ovarium berfungsi pada waktu dewasa kelamin. Hormon FSH dan LH yang terbentuk dilepaskan ke dalam sistem sirkulasi, dan berjalan menuju organ reproduksi (testis dan ovarium) yang merupakan tempat untuk mengontrol hormon gonadal dan produksi gamet (Predergast, 2002). Secara spesifik hormon *gonadotropin* FSH dan LH berperan dalam pertumbuhan folikel di ovarium dan koordinasi untuk produksi hormon seks wanita. Syahrums (1994) menambahkan bahwa FSH yang dihasilkan oleh hipofisis anterior menginduksi ovarium dan folikel – folikel yang lebih muda untuk berkembang. Pada wanita, FSH dapat meningkatkan maturasi folikel dan produksi estrogen di dalam sel granulosa folikel. Estrogen (estrone, estradiol, estriol) pada stimulasi pertama dilepaskan oleh *gonadotropin* (efek umpan balik positif) sampai terjadinya maturasi folikel sehingga memicu untuk terjadi ovulasi dan pembentukan *corpus luteum* (Stefen, 2000). Selain itu ovarium

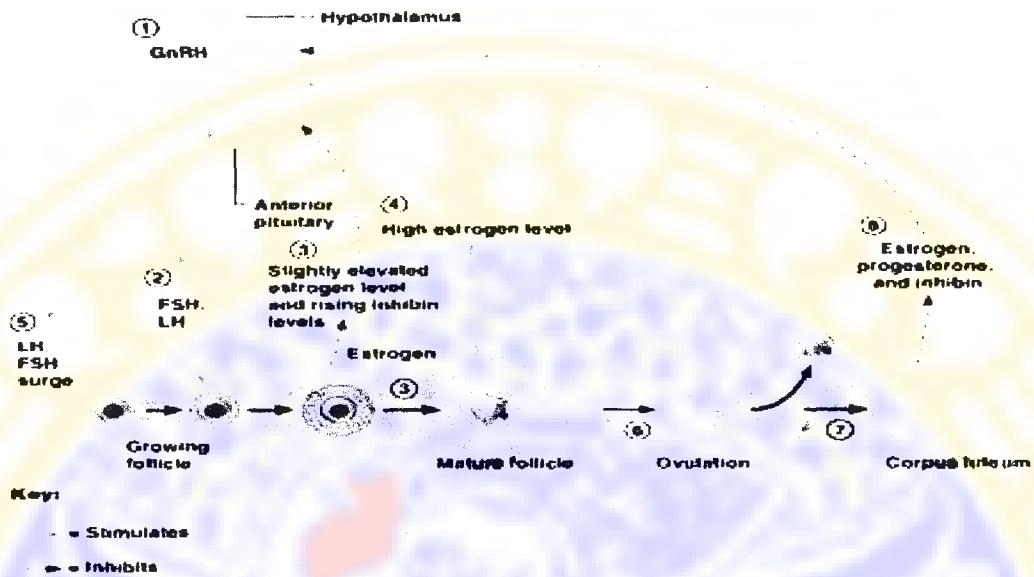
merupakan sumber penghasil utama estrogen. Pada kondisi tertentu estradiol dapat merangsang pelepasan FSH dan LH, keadaan ini disebut umpan balik positif (Greenspan, 1997; Guyton, 2000). Progesteron (progesterone dan analognya) dibentuk oleh *corpus luteum* di bawah pengaruh LH dan estrogen (setelah ovulasi) yang menghambat pelepasan *gonadotropin*. Konsentrasi *gonadotropin* akan turun kembali seperti semula. Sel granulosa juga membentuk inhibin dan *activin* ketika sel teka membentuk androgens androstenedion dan testosteron. *Activin* meningkatkan pelepasan *gonadotropin*, ketika inhibin disupresi (Stefen, Florian, 2000). Pada fase folikuler, kadar inhibin turun yang diikuti dengan meningkatnya FSH sehingga mendorong pertumbuhan folikel (Ganong, 2000). Hormon seks wanita yang berlebihan biasanya disebabkan suplai eksogen (pil kontrasepsi), beberapa tumor yang menghasilkan hormon seks. Penurunan estrogen dan progestin merupakan akibat menurunnya pelepasan GnRH pada beberapa kondisi psikologik atau stres fisik (seperti malnutrisi, penyakit sistemik, olah raga yang berlebihan) (Stefen, 2000) dilihat pada *gambar 2.6*.

Pada siklus menstruasi peninggian kadar estradiol pada bagian akhir fase folikular akan mengawali lonjakan LH praovulasi. Peninggian sekresi LH merangsang peningkatan sekresi progesteron dalam jumlah kecil dan peningkatan estradiol terjadi pada pertengahan fase proliferasi (Greenspan, 1997; Guyton, 2000).

A. Release of Female Sex Hormones



Gambar 2.6. Pelepasan hormon seks wanita (Stefan, 2000)



Gambar 2.7. Hubungan Sistem Saraf dengan Sistem Endokrin (Speroff,1994)

2.9 Hipotalamus dan Sekresi GnRH

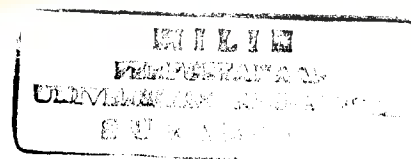
Hipotalamus merupakan bagian dari diencephalon, yang berada di dasar otak dan membentuk dasar ventrikel tiga dan sebagian dari dinding lateralnya. Di dalam hipotalamus terdapat sel peptinerjik neural yang mengeluarkan hormon-hormon yang bersifat merangsang pelepasan dan menghambat (*releasing and inhibiting hormones*). Sel-sel ini bersifat sebagai neuron tetapi juga bersifat sebagai kelenjar endokrin. Sel-sel ini mendapat rangsangan melalui aliran darah, dan juga mendapat rangsangan melalui neurotransmitter di dalam otak, dalam proses yang dikenal sebagai neurosekresi. Pada neurosekresi ini, neurohormon atau neurotransmitter disintesis di ribosom dalam sitoplasma neuron, kemudian dimasukkan ke dalam granul dalam aparatus

Golgi yang selanjutnya diangkut melalui aliran aktif aksonal ke ujung saraf untuk disekresikan ke dalam pembuluh darah atau menyeberangi sinaps. Perubahan yang progresif FSH dan LH disebabkan aktifasi sekresi pulsatil GnRH (Speroff, 1994).

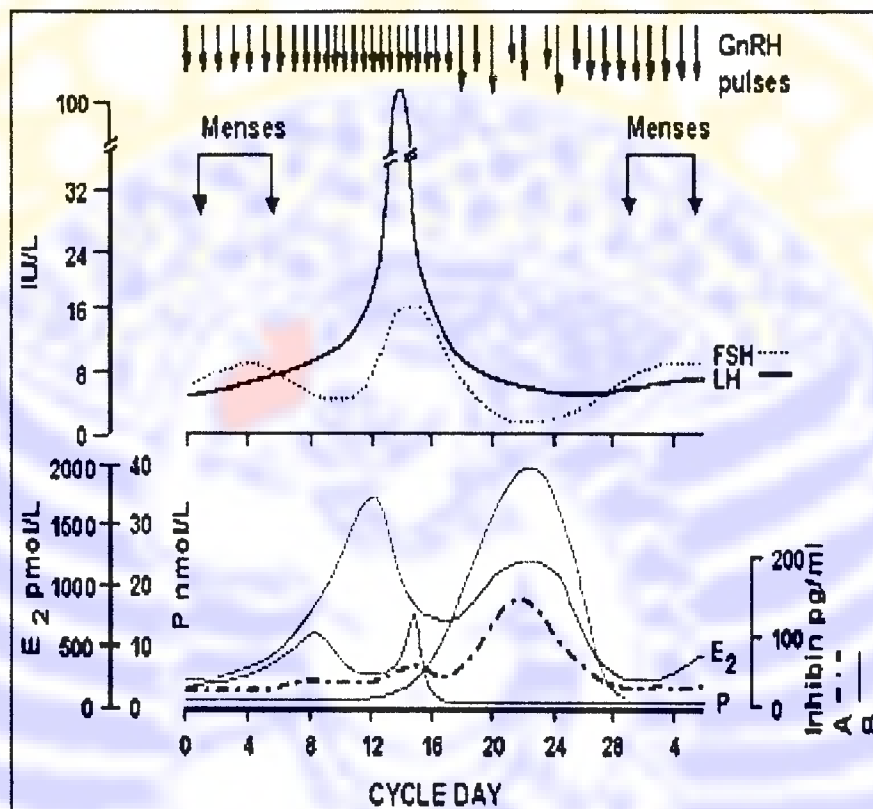
Pelepasan GnRH dapat berkurang melalui pengaruh neurotransmitter E, NE, dopamin, serotonin, endorphins, disamping itu juga bisa disebabkan karena konsentrasi GnRH yang terlalu tinggi dapat menurunkan pelepasan *gonadotropin* (*Down Regulation* reseptor GnRH) (Cunningham, 2000). Bahkan jika hipotalamus tidak rusak, pelepasan *gonadotropin* dapat terganggu dengan adanya kerusakan pada hipofisis (perdarahan, iskemia, inflamasi, trauma), penggantian sel produksi *gonadotropin* oleh tumor, atau penghambatan peningkatan konsentrasi hormon seks (inhibitor ovulasi, substansi anabolik dengan kerja androgen, tumor, sindrom adrenogenital) (Stefen, 2000).

Waktu paruh GnRH hanya 2-4 menit. Padahal kontrol siklus reproduksi tergantung dari pelepasan GnRH yang konstan fungsi ini dapat dicapai karena ada hubungan yang kompleks antara hormon pelepasan, neurohormon yang lain, gonadotropin hipofisis dan steroid gonad. Hubungan ini dikenal dengan hubungan umpan balik positif merangsang dan negatif menghambat. Lingkar umpan balik panjang adalah umpan balik hormon kelenjar target di dalam sirkulasi dengan hipotalamus atau hipofisis. Lingkar umpan balik pendek adalah hubungan negatif gonadotropin pada sekresi hipofisis, diduga melalui efek hambatan pada GnRH di hipotalamus. Umpan balik sangat pendek hambatan oleh hormon pelepasan pada sintesisnya sendiri (Speroff, 1994).

Konsep yang banyak dianut adalah menganggap *nucleus arkuatus* sebagai sentral kerja, melepaskan GnRH ke dalam sirkulasi portal secara pulsatil. Dari berbagai penelitian dapat ditunjukkan bahwa sekresi gonadotropin yang normal memerlukan pengeluaran GnRH secara pulsatil dengan frekuensi dan amplitudo dalam batas kritis. Dengan berbagai percobaan manipulasi menunjukkan bahwa batas kritis sekresi pulsatil GnRH agak sempit. Contoh penelitian pada kera yang diberi 1 mikrogram GnRH per menit untuk 6 menit setiap jamnya (1 pulsasi per jam) menghasilkan konsentrasi di dalam darah portal kurang lebih sama dengan puncak konsentrasi GnRH dalam darah portal manusia ± 2 ng/ml. Kenaikan frekuensi pulsasi GnRH menjadi 2 dan 5 pulsasi perjam akan menghentikan sekresi gonadotropin. Sekresi gonadotropin juga akan turun bila dosis GnRH dinaikkan. Penurunan frekuensi pulsasi menyebabkan penurunan



meningkat menjadi satu kali per 60-70 menit. GnRH meningkatkan pelepasan hormon FSH dan LH dimana LH lebih sensitif terhadap perubahan kadar GnRH (Greenspand, 1997; Guyton, 2000; Speroff, 1994).



Gambar 2.8. Kadar hormon pada siklus menstruasi (Prendergast,2002).

Siklus ini diatur oleh perubahan pulsasi GnRH, yang membedakan sekresi gonadotropin. Perkembangan folikel distimulasi oleh FSH untuk memproduksi estrogen yang disebabkan oleh umpan balik positif untuk menghasilkan lonjakan LH. Setelah ovulasi, korpus luteum menghasilkan progesteron, yang menyebabkan menurunnya pulsasi GnRH dan menurunkan LH. Panah menunjukkan pulsasi GnRH, sedangkan panjang panah menunjukkan jumlah

sekresi GnRH. Jarak antar panah menunjukkan interval pulsasi (frekuensi) (Prendergast, 2002).

2.10 Stres dan Sekresi GnRH

Reproduksi biasanya sensitif terhadap gangguan dari endogenous dan exogenous pada kedua jenis kelamin. Fungsi *gonadal axis* dapat berubah di bawah suatu kondisi tertentu seperti : bahan kimia yang mengganggu endokrin, latihan yang berlebihan, hipoglikemi atau sakit sehingga terjadi ketidakseimbangan pada *hipotalamus-hipofisis-ovarian axis* (HPO axis) sehingga dapat menimbulkan gangguan atau supresi ovulasi (Robinovici, 1993).

Latihan yang kronik diketahui dapat mengganggu siklus menstruasi walaupun siklus masing-masing individu bervariasi. Gangguan menstruasi yang diakibatkan dari latihan kronik meliputi terlambatnya *menarche*, fase luteal yang singkat dan tidak adekuat, bahkan terjadi *amenorrhea* sekunder. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya infertil yang reversibel. Latihan dapat mengganggu pulsasi GnRH dan merangsang peningkatan kortisol dan endorfin. Perubahan ini merupakan fenomena adaptasi dari endokrin (Bonen, 1994). Latihan atau stres dapat mengaktifkan saraf simpatis dan respon adrenal (Edward, 1993). Aktivasi sistem saraf simpatis oleh stresor dapat menyebabkan pelepasan neurotransmitter NE lokal pada ujung saraf simpatis postganglionik, sedangkan stresor pada medula adrenal adalah merangsang lepasnya E ke dalam sirkulasi (Norman, 1987). Kontrol pulsasi GnRH dapat diatur oleh katekolaminergik (E dan NE) dengan cara memberikan umpan balik positif terhadap sekresi GnRH. Kemungkinan kerja dari katekolamin adalah dengan merubah frekuensi (dan

mungkin amplitudo) pelepasan GnRH. Kenaikan frekuensi pulsasi GnRH dan peningkatan amplitudo dapat menurunkan dan menghentikan sekresi *gonadotropin (Down Regulation reseptor GnRH)* (Speroff, 1994; Stefen, 2000).

Stresor merupakan faktor yang sangat kuat dalam mempengaruhi *gonadal axis* karena pada kondisi ini akan terjadi peningkatan *Corticotropin Releasing Hormone (CRF)* dan β -endorfin pada hipotalamus yang menghambat gonadotropin, oxytocin dan vasopressin (Laatikaine, 1991). Stres akut dapat menstimulasi peningkatan androgen yang diakibatkan oleh penurunan metabolisme androgen bukan karena gangguan pada pelepasan androgen. Penurunan metabolisme androgen dapat menurunkan kadar estrogen didalam darah dimana estradio! ini sangat berperan didalam peningkatan aktivasi dari FSH dan kelangsungan pertumbuhan folikel pada tahap berikutnya (Cunningham,2000). FSH juga berperan menstimulasi sistem aromatase sel granulosa (GCs) untuk membentuk reseptor LH, hal ini difasilitasi oleh estrogen. LH yang terbentuk berperan dalam meningkatkan pertumbuhan folikel preovulatori (tersier dan de graaf) (Filicori & Cognigni,2000; Pacak Karel & Palkovitis, 2001).

Penghentian dan hilangnya lonjakan *gonadotropin* akan memicu dan mempercepat terjadinya atresia folikel (Annas,2004). Stres akut dapat menstimulasi peningkatan androgen yang diakibatkan oleh penurunan metabolisme androgen bukan karena gangguan pada pelepasan androgen (Pacak Karel & Palkovitis (2001). Androgen mempunyai sifat atretogenik terhadap folikel yang menyebabkan banyak terjadi piknotik sel granulosa dan degenerasi sel oosit. Pada konsentrasi tinggi akan di metabolisme oleh sel granulosa menjadi 5

α -androgen yang merupakan androgen sangat poten, androgen ini tidak bisa dirubah menjadi estrogen dan menghambat pembentukan reseptor LH yang essential untuk pertumbuhan folikel serta menghambat aktifitas aromatase. Dengan demikian bila rasio androgen-estrogen meningkat akan memicu proses apoptosis folikel (Annas, 2004).

Pulsasi GnRH diatur oleh 2 sistem katekolaminergik yaitu NE menstimulasi positif dan dopamine menghambat sekresi GnRH. Kemungkinan cara kerja katekolamin adalah merubah frekuensi (dan mungkin amplitudo) pelepasan GnRH. Faktor farmakologi atau psikologi dapat mempengaruhi fungsi tirosin, kemungkinan melalui sintesis atau metabolisme katekolamin (Speroff, 1994).

2.11 Uraian tentang Mencit (*Mus musculus*)

Mencit merupakan hewan poliestrus, birahinya berlangsung antara 4-5 hari. Fase-fase selama siklus birahi dapat diikuti dengan jelas. Fase estrus berlangsung 12-14 jam dan ovulasi secara spontan menjelang akhir dari periode estrus. Perkawinan terjadi pada waktu estrus dan fertilisasi terjadi 2 jam sesudah kawin. Proses implantasi terjadi antara 4-5 hari sesudah fertilisasi. Mencit mencapai dewasa pada umur 35 hari dengan berat badan pada mencit jantan 20-40 gram sedangkan mencit betina 18-35 gram. Umur untuk melakukan perkawinan baik pada jantan maupun betina adalah 8 minggu. Kebuntingan terjadi selama 19-21 hari dan jumlah anak yang dilahirkan antara 6-15 ekor (Smith & Mangkoewidjojo, 1988).

2.12 Anatomi Ovarium pada Mencit (*Mus musculus*)

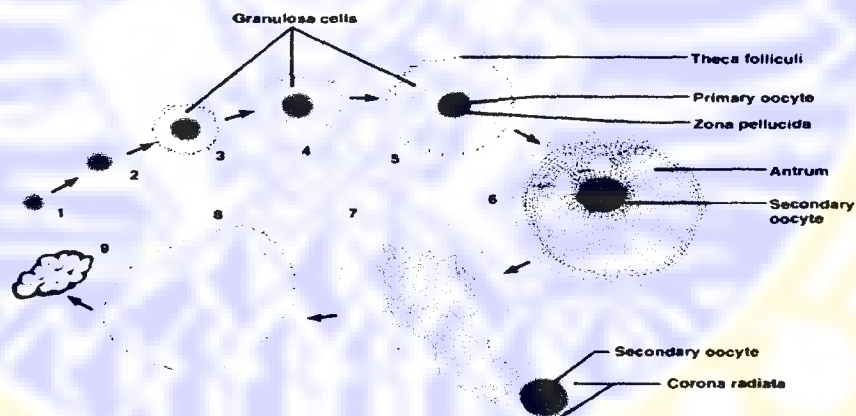
Ovarium merupakan organ reproduksi primer hewan betina yang mempunyai dua fungsi utama, yaitu fungsi reproduktif yang menghasilkan sel telur dan fungsi endokrinologis yang menghasilkan hormon-hormon kelamin betina yaitu estrogen, progesteron dan relaksin (Ismudiono, 1999). Ovarium pada hewan betina homolog dengan testis pada hewan jantan (Harjopranto, 1984 dan Toelihere, 1981)

Ovarium jumlahnya sepasang yang terletak di uterus kanan dan kiri di dalam rongga pelvis. Ovarium diikatkan ke dinding dorsal tubuh pada *broad ligament* uterus oleh mesovarium dan ke uterus sendiri oleh ligamen. Kebanyakan vertebrata kedua gonad berkembang dan berfungsi bersama-sama (Yatim, 1994). Secara embriologi maupun histologi, ovarium sebelah kanan menerima suplai darah dari arteri melalui arteri ovarium secara langsung dari aorta ke vena kava inferior langsung ke ovarium sebelah kanan sedangkan ovarium sebelah kiri darah dari aorta menuju vena renalis sebelah kiri kemudian ke vena kava inferior baru ke ovarium kiri (Thomson, 2001).

Permukaan ovarium hewan yang belum mencapai dewasa kelamin dan belum mencapai dewasa kelamin dan belum mengalami ovulasi secara teratur masih licin, tetapi setelah hewan mencapai dewasa kelamin maka permukaan ovarium tidak licin lagi karena terbentuknya folikel baru dan folikel de graaf, korpus luteum dan korpus albikan. Besarnya ovarium bertambah sesuai dengan pertambahan umur dan banyaknya melahirkan pada mencit betina. Pada hewan betina yang sering melahirkan, ovarium dapat menjadi dua kali besarnya dari ovarium betina remaja (Hasjim, 1981)

Bentuk ovarium berbeda-beda menurut spesies hewan tergantung pada jumlah anak yang dilahirkan. Hewan –hewan betina *polytocous*, mempunyai bentuk ovarium seperti buah murbei yang terdiri dari korteks (bagian luar) dan medula (bagian dalam), misalnya pada babi dan tikus (Hafez,1970). Korteks tersusun atas sel-sel germinatif, folikel muda, folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf (Yatim, 1994). Selain itu juga terdapat folikel yang sedang berdegenerasi, korpus luteum serta jaringan ikat kolagen, pembuluh-pembuluh darah, pembuluh limfe, serabut saraf dan jaringan otot polos (Hafez, 1993)

Ovarium terdiri atas 2 bagian yaitu bagian kortek (bagian paling luar ovarium) dan medula (bagian dalam ovarium). Aktivitas ovarium terpenting terjadi pada korteks, pada bagian ini terjadi perkembangan folikel. Perkembangan folikel meliputi perubahan ukuran folikel, jumlah lapisan sel granulosa, perkembangan sel-sel teka eksterna dan posisi oosit dikeliling kumulus oophorus (Hafez *et al*, 1993). Struktur anatomi mikroskopis dapat dilihat pada *gambar 2.9*



Gambar 2.9. Struktur anatomi mikroskopis korteks ovarium pada mencit betina (Speroff,1994)

Pada bagian medula (bagian dalam) mengandung banyak tenunan pengikat fibroblas, serabut-serabut saraf, pembuluh limfe dan pembuluh darah yang berbentuk spiral banyak yang menuju ke ovarium melalui mesovarium dan masuk ovarium melalui hilus ovarii (Yatim, 1994).

2.13 Siklus Birahi Mencit Betina (*Mus musculus*)

Mencit adalah binatang ovulator spontan yang artinya ovulasi terjadi di bawah pengaruh hormon, dimana hormon FSH dan LH merangsang pertumbuhan folikel dan sekresi estradiol. Estradiol yang tinggi akan menyebabkan timbulnya birahi (estrus). Siklus birahi merupakan ritme fungsi fisiologis dari sistem kelamin yang terdapat pada hewan ternak setelah mencapai pubertas (Ismudiono,1999). Berdasarkan banyaknya siklus birahi yang dialami, terdapat hewan monoestrus dan poliestrus (Yatim,1994). Mencit merupakan hewan poliestrus yang artinya dalam satu tahun mengalami beberapa kali birahi kecuali jika terjadi kebuntingan. Pada mencit dalam satu siklus birahi terjadi empat fase yang dapat diamati dengan jelas secara mikroskopis yaitu : fase proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Hafez,1980). Siklus birahi pada mencit ini terjadi secara berkala menurut interval tertentu, biasanya 4-5 hari. Selama siklus birahi berlangsung terjadi perubahan pada sel-sel epitel vagina dan uterus dari tiap fase, sehingga pemeriksaan preparat hapusan mukosa vagina dapat digunakan untuk mengetahui fase siklus birahinya (Hafez,1980).

Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan rangsangan pertumbuhan folikel oleh FSH (*Follicle Stimulating Hormone*). Folikel yang sedang tumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung hormon estrogen

yang lebih banyak yang disebut dengan estradiol. Kadar estradiol pada fase ini paling tinggi bila dibandingkan dengan fase estrus lainnya. Hormon estrogen (estradiol) inilah yang akan mempengaruhi vaskularisasi mukosa vagina dan uterus dan meningkatkan pertumbuhan sel-sel epitel dan lapisan bersilia tuba falopii (Hafez, 1980; Yatim, 1994; Fuguay, 1980).

Ismudiono (1999) menyatakan bahwa pada saat ini vulva agak membengkak dan vestibulum berwarna kemerahan karena adanya kongesti pembuluh darah. Pada preparat hapusan vagina terlihat banyak sel epitel berinti. Periode ini berlangsung cepat dan mencit betina mulai menampakkan gejala birahi walaupun belum bisa menerima pejantan untuk melakukan kopulasi. Periode ini berlangsung selama 12 jam (Hill, 1997; Hafez, 1980).

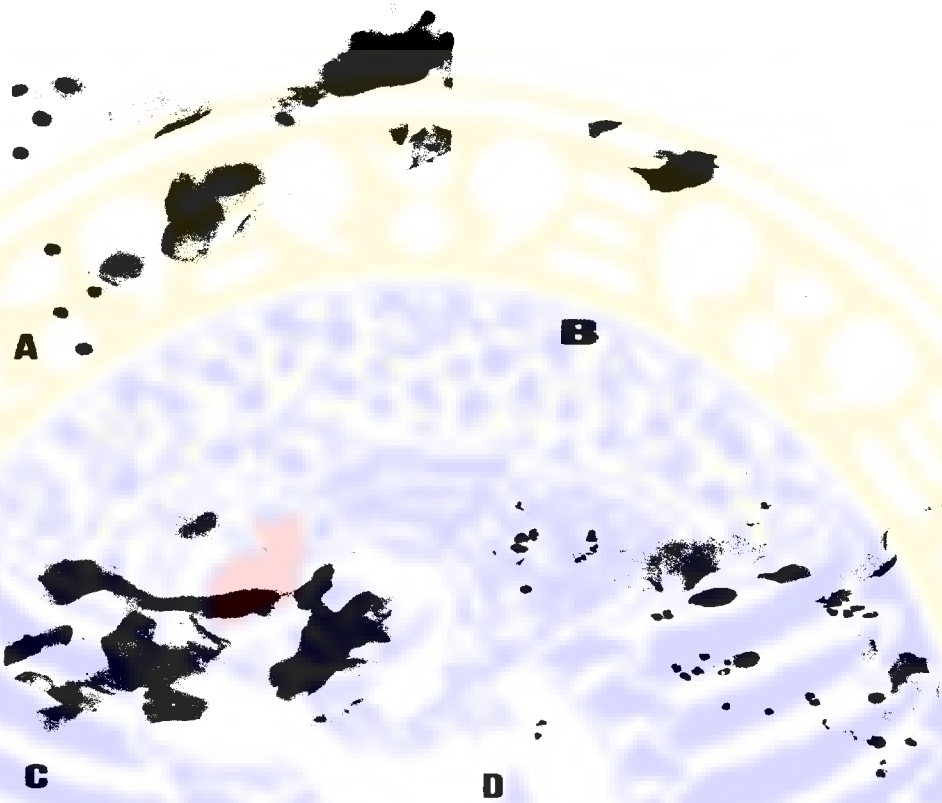
Pada fase estrus ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik (gelisah), mau menerima pejantan untuk berkopulasi. Perubahan yang terjadi pada alat kelamin waktu siklus estrus adalah di ovariumnya terdapat pertumbuhan folikel yang mulai sejak fase proestrus, yang meningkat mencapai maksimal yang disebut dengan folikel De graaf. Pada folikel De graaf terdapat estradiol yang dapat menyebabkan perubahan pada saluran reproduksi mencit seperti tuba falopii yang menegang dan berkontraksi serta ujung dari fimbriae merapat pada folikel De graaf. Uterus menegang karena suplai darah bertambah dan mukosa tumbuh dengan cepat. Lendir serviks dan vagina bertambah dan mukosa vagina menebal serta vulva mengalami oedema. Keseimbangan hormon berubah dari pengaruh FSH menjadi di bawah pengaruh LH (*Luteinizing Hormone*). LH disini membantu terjadinya ovulasi dan awal pembentukan badan kuning (korpus luteum). Pada pemeriksaan hapusan vagina banyak terdapat sel epitel yang

berkonifikasi/penandukan. Periode ini berlangsung selama 12 jam (Hafez, 1980; Partodihardjo, 1980). Menurut Fox dan Laird (1990) dapat berlangsung selama 9-15 jam. Sedangkan Hill (1997) melaporkan bahwa pada fase estrus berlangsung selama 13 jam dan biasanya melepaskan 10-20 telur.

Metestrus (post estrus) terjadi segera setelah ovulasi dan mencit betina menolak pejantan untuk berkopulasi. Pada fase ini ditandai juga dengan birahi yang berhenti secara tiba-tiba, folikel pecah kemudian terjadi ovulasi dan rongga folikel mengecil secara berangsur-angsur (Ismudiono, 1999). Setelah folikel pecah, pada ovarium terjadi pembentukan badan kuning (korpus luteum) di tempat folikel De graaf yang baru selesai melepaskan sel telur (ovulasi). Sel telur yang dilepaskan ke dalam tuba falopii menuju ke uterus. Pada saat ini serviks menutup dan kelenjar-kelenjar serviks berubah sekresinya dari cair menjadi kental. Lendir kental ini berfungsi sebagai sumbat lumen serviks. Pada fase ini telah terjadi vagina menjadi tipis karena terjadi pelepasan permukaan epitel vagina dan tidak diimbangi dengan proliferasi sel yang terdapat pada lapisan basal, akibat dari penurunan estradiol dan pengaruh progesteron. Membran basalis menghilang dan terjadi infiltrasi leukosit ke dalam epitel, sehingga pada hapusan vagina terlihat adanya leukosit dan beberapa sel epitel yang berkornifikasi (Hill, 1999). Fase metestrus pada mencit berlangsung selama 21 jam (Toelihere, 1979; Hafez, 1980).

Diestrus merupakan fase paling lama dalam siklus birahi yaitu berlangsung 57 jam (Tolihere, 1970; Hafezt, 1980). Menurut Fox dan Laird (1970) sekitar 60-70 jam. Fase ini ditandai dengan selaput lendir vagina yang tipis, perkembangan korpus luteum yang menghasilkan hormon progesteron. Di

bawah pengaruh progesteron ini, mukus kental disekresi, epitel mengalami proliferasi, endometrium menebal, kelenjar dan urat daging uterus berkembang sebagai persiapan uterus untuk menampung dan memberi makan embrio serta pembentukan plasenta jika terjadi kebuntingan (Ismudiono, 1999). Bila tidak terjadi fertilisasi maka korpus luteum akan tetap berfungsi selama 80-90 jam. Selanjutnya PGF₂ (Prostaglandin F₂ alfa) yang dihasilkan oleh endometrium akan meregresi korpus luteum, sehingga kadar progesteron dalam darah menurun dan mulailah siklus birahi berikutnya. Pada preparat hapusan vagina yang terlihat hanya leukosit (Hafezt, 1980; Toelihere, 1981; Turner dan Bagnara, 1986). Hapusan mukosa vagina yang memperlihatkan siklus proestrus, estrus dan diestrus dapat dilihat pada *gambar 2.10*



Gambar 2.10. Hapusan mukosa vagina yang memperlihatkan siklus birahi : proestrus yang ditandai dengan sel epitel berinti (A), estrus didominasi sel epitel berkornifikasi (B & C), diestrus hanya terlihat leukosit (D). (Young, Boling, & Blandau, 1941)

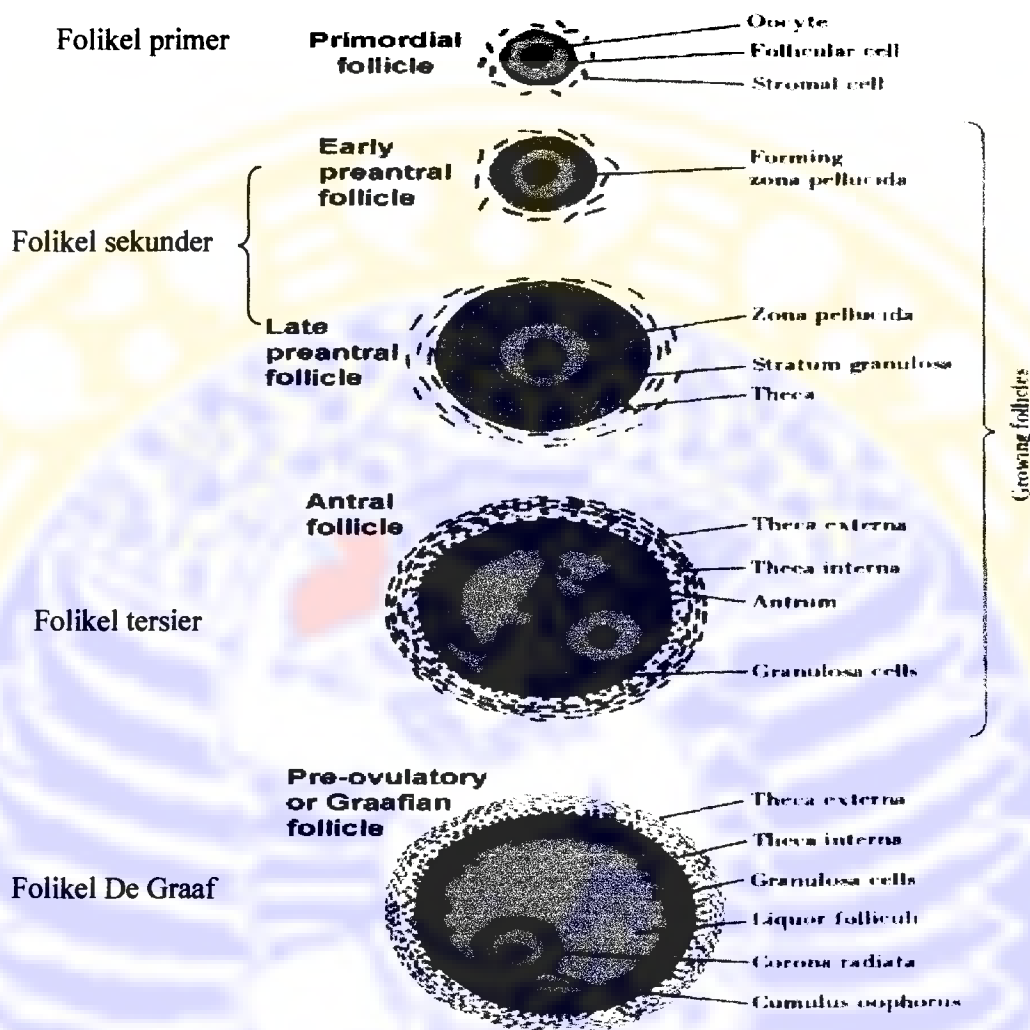
2.14 Perkembangan Folikel pada Mencit (*Mus musculus*)

Perkembangan folikel didahului dengan pertumbuhan dan bertambah banyaknya sel pipih yang mengelilingi oosit. Sel pipih ini lambat laun akan menyerupai bentuk kuboid, kemudian berjajar dan membentuk banyak lapisan sel di sekitar oosit (Ismudiono, 1999). Folikel mencapai pematangan melalui tingkatan perkembangan yaitu : folikel primer, sekunder, tersier (yang sedang tumbuh) dan folikel De Graaf (yang sudah matang).

Pertumbuhan folikel dapat dibagi menjadi 4 tahap (Guyton, 2001), yaitu :

1. Tahap pertama, merupakan tahap terbentuknya folikel primer dari satu sel epitel benih yang membelah diri, terjadi pada saat hewan betina masih di dalam kandungan dan setelah lahir
2. Tahap kedua, merupakan tahap pertumbuhan folikel sekunder yang terjadi pada waktu hewan betina telah lahir dan menjalani proses pendewasaan.
3. Tahap ketiga, merupakan tahap pertumbuhan folikel sekunder menjadi folikel tersier yang terjadi pada waktu hewan menjelang dewasa kelamin dan dilanjutkan pada waktu hewan mengalami siklus birahi
4. Tahap keempat, adalah tahap pematangan folikel. Pada saat ini folikel tersier ukurannya bertambah besar seiring dengan bertambah besarnya rongga antrum yang terbentuk karena adanya pertumbuhan sel-sel granulosa yang ada di bagian kulit folikel yang lebih cepat. Sehingga di bagian dalam terbentuk ruangan dan cairan folikuli bertambah banyak.

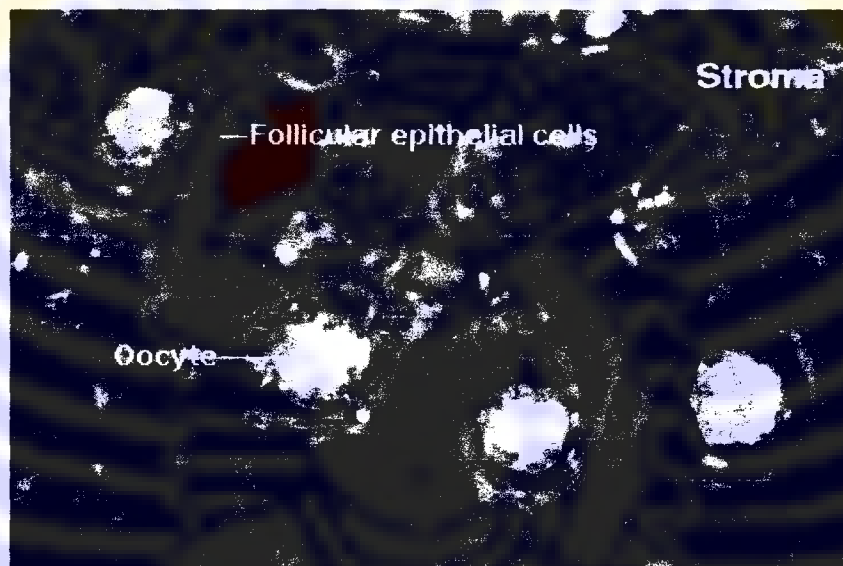
Keempat tahap folikulogenesis tersebut diilustrasikan seperti *gambar 2.11*



Gambar 2.11. Tahap perkembangan folikel ovarium yang diawali dengan folikel primordial sampai folikel de Graaf (Ross, 2000)

Folikel primer/primordial terdiri dari satu bakal sel telur yang disebut oogonium dan selapis sel folikel kecil. Selapis tebal folikel-folikel ini berkumpul di bawah tunika albugenia. Folikel primer ini berasal dari satu sel epitel benih yang membelah diri. Sel yang akan menjadi ovum berada ditengah-tengah dikelilingi oleh sel-sel kecil hasil pembelahan tadi (Hafezt, 1980; Partodiharjo, 1980). Sel-sel kecil ini merupakan lapisan sel yang tebal yang disebut membran

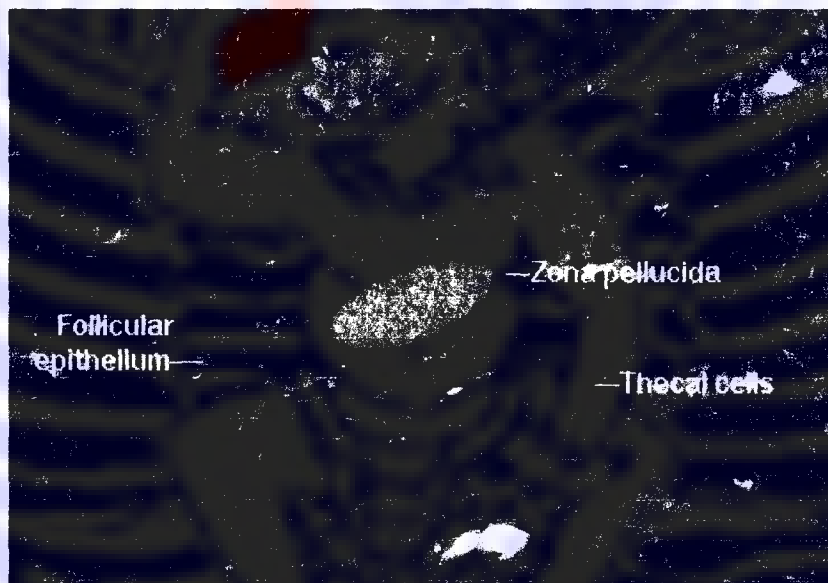
granulosa. Sel epitel folikuler yang mengelilingi oosit akan berubah menjadi sel kuboid, oosit menjadi metabolik aktif dan memulai sintesis sitoplasma baru sehingga menyebabkan pembesaran (www.education.vetmed.vt.edu). Folikel primer ini pada umumnya berada langsung di bawah kulit ovarium yang sangat tipis yang disebut tunika albugenia (Hafezt *et al*,1980; Partodiharjo, 1980). Folikel ini dapat dilihat pada *gambar 2.12*



Gambar 2.12. Folikel primer ovarium (www.education.vetmed.vt.edu).

Tahap selanjutnya adalah pembentukan folikel sekunder. Oosit telah mencapai ukuran maksimum, dan sel epitel folikular berkembang dengan membentuk banyak lapisan, dan terbentuknya zona pelucida. Zona Pelucida (ZP) adalah suatu lapisan *glycoprotein* berperan melindungi oosit dan juga berperan sebagai penghalang dari *polyspermy* setelah terjadinya ovulation. ZP diproduksi oleh sel epitel folikel yang terdekat dengan oosit.

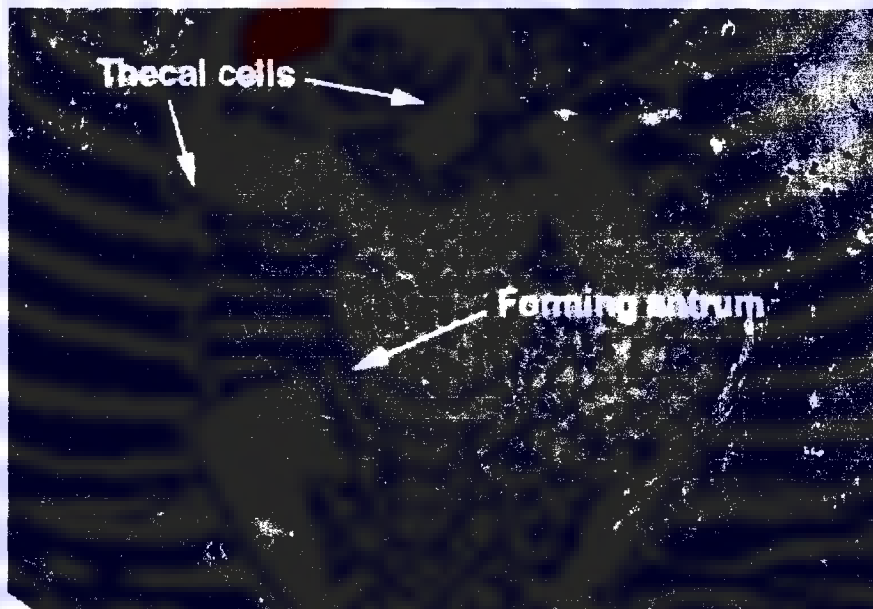
Beberapa sel di dalam stroma ovarian menjadi terorganisir untuk membantu proses perkembangan folikel. Satu komponen populasi sel stromal adalah prekursor sel teka (www.education.vetmed.vt.edu). Folikel sekunder berkembang ke arah pusat stroma korteks pada waktu kelompok sel –sel folikuler yang memperbanyak diri membentuk suatu lapisan multiseluler sekeliling vitelus (Toelihere, 1981). Apabila di luar membran vitelina sudah terbentuk lagi membran yang lebih tebal, yang disebut sebagai zona pelucida, maka folikel ini telah sempurna disebut folikel sekunder (Partodihardjo, 1980).



Gambar 2.13. Folikel sekunder ovarium (www.education.vetmed.vt.edu).

Folikel tersier adalah folikel sekunder yang telah tumbuh lebih dewasa, dimana sel-sel granulosanya telah banyak, hingga seluruh folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari korteks ovarium. Pertumbuhan sel-sel granulosa yang ada di bagian kulit folikel lebih cepat, sehingga di bagian dalam terjadi ruang yang disebut dengan antrum. Mula-mula antrum ini hanya satu

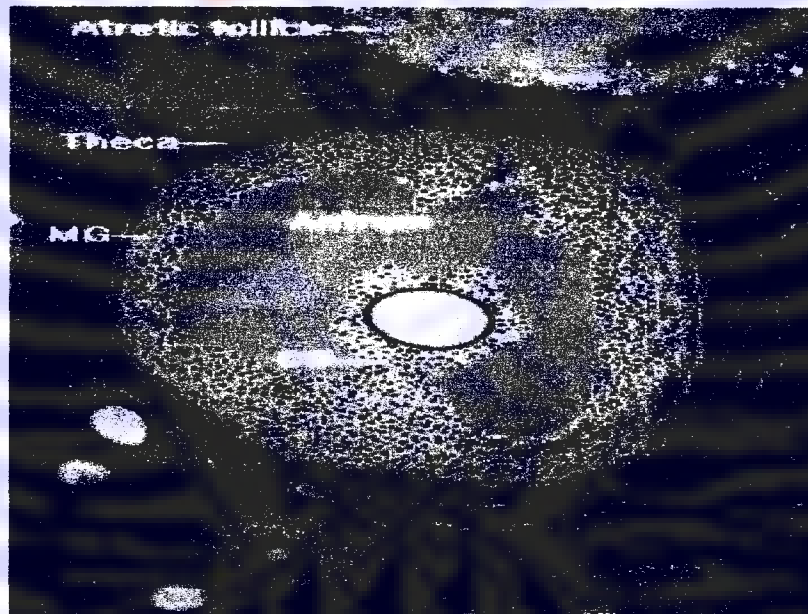
kemudian bertambah banyak yang disebut antra (Partodihardjo, 1980). Pertambahan jumlah antrum ini sesuai dengan pertumbuhan folikel maka dinding yang membatasi antrum satu dengan yang lain akan pecah, sehingga jumlah antra akan berkurang, tetapi besarnya bertambah hingga akhirnya menjadi satu (Turner dan Bagnara, 1986; Partodihardjo, 1980). Antrum dibatasi oleh banyak lapisan sel folikuler yang dikenal sebagai membran granulosa yang diisi oleh suatu cairan jernih yang disebut dengan *Liquor Foliculi* yang kaya dengan protein dan estrogen (Toelihere, 1981).



Gambar 2.14. Folikel tersier ovarium (www.education.vetmed.vt.edu).

Folikel de Graaf adalah bentuk folikel terakhir dan terbesar pada ovarium yang hanya terdapat pada hewan-hewan betina dewasa yang sedang birahi atau menjelang birahi. Ovum dalam folikel De Graaf terbungkus oleh masa sel yang disebut dengan kumulus ooforus yang menonjol ke dalam ruang antrum yang

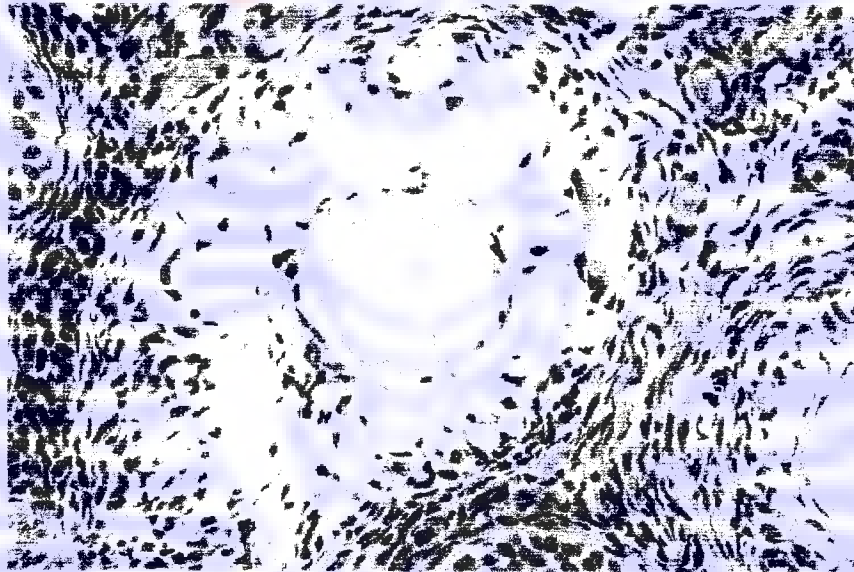
penuh dengan cairan folikel (Partodihardjo, 1980). Diameter folikel De Graaf berbeda menurut jenis hewan. Karena ukurannya selalu bertambah, folikel De Graaf yang matang menonjol keluar melalui korteks ke permukaan ovarium. Pertumbuhannya meliputi dua lapisan sel stroma korteks yang mengelilingi sel-sel folikuler. Lapisan sel-sel tersebut membentuk teka folikuli yang dapat dibagi atas teka interna yang vaskuler dan teka eksterna yang fibrous. Estrogen disekresikan langsung dari sel – sel teka interna ke dalam folikel melalui selubung dasar (membran propia) yang memisahkan teka interna dengan membran granulosa (Toilehere,1981). Dapat dilihat pada gambar 2.15.



Gambar 2.15. Folikel De Graaf Ovarium (www.education.vetmed.vt.edu).

Atresia folikel merupakan degenerasi yang disebabkan hilangnya ovum dari ovarium tanpa melalui ovulasi. Ovum di dalam folikel atresi dapat melepaskan benda-benda kutupnya dan mengalami pembelahan mitosis maupun mitosis, dengan demikian menghasilkan beberapa sel di dalam zona pelusida

(Turner dan Bagnara, 1986). Jumlah ovum pada saat hewan baru lahir adalah beberapa kali lebih banyak dibanding saat hewan mencapai dewasa kelamin, hal ini terutama disebabkan oleh kegagalan folikel menjadi matang (atresia folikel). Selama atresia sel-sel teka interna membesar dan memasuki ovum maupun sel-sel granulosa yang mengalami degenerasi serta menyebabkan resorpsi (Toilehere, 1981). Perkembangan folikel abnormal selain folikel atresia juga didapatkan folikel sistik yaitu yang terjadi karena sekresi FSH cukup, sedang LH kurang dari ambang sehingga tidak dapat terjadi ovulasi (Hafez *et al*, 1980; Hardjopranjoto, 1984).



Gambar 2.16. Folikel Ovarium yang Atresia (www.education.vetmed.vt.edu).

2.15 Ovulasi dan Pembentukan Korpus Luteum

Penyebab terjadinya ovulasi adalah jumlah LH (Luteinizing Hormone) yang sangat banyak disekresi oleh kelenjar hipofisis anterior. Luteinizing Hormone ini mengakibatkan sekresi hormon-hormon steroid folikular secara cepat, yang mengandung sejumlah kecil progesteron. Pada beberapa jam kemudian akan berlangsung peristiwa penting untuk ovulasi, yaitu :

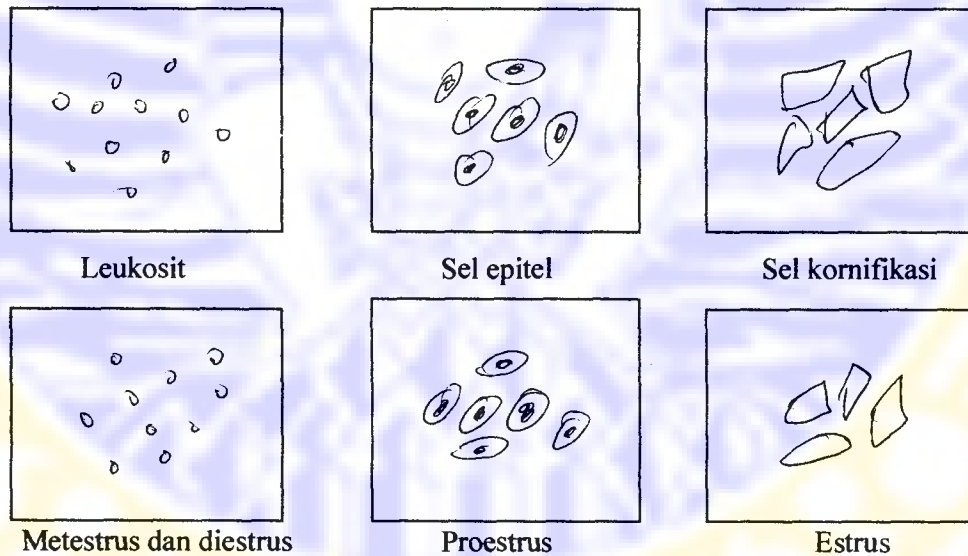
1. Teka eksterna mulai membentuk enzim proteolitik yang mengakibatkan pelarutan dari dinding kapsul dan melemahnya dinding, menyebabkan seluruh folikel makin membengkak dan degenerasi dari stigma.
2. Secara bergantian, akan terjadi pertumbuhan yang berlangsung cepat dari pembuluh darah baru ke dalam dinding folikel, dan pada saat yang bersamaan prostaglandin akan disekresi pada jaringan folikular. Kedua efek ini mengakibatkan transudasi plasma ke dalam folikel yang berperan pada pembengkakan folikel. Kombinasi dari pembengkakan folikel dan degenerasi stigma menyebabkan pecahnya folikel disertai dengan pelepasan ovum. Peristiwa ini dinamakan ovulasi (Guyton, 2000). Secara skematis mekanisme ovulasi tertera pada gambar berikut .

Menurut Guyton (2000), beberapa jam pertama setelah keluarnya ovum dari folikel, sel-sel granulosa yang tersisa mulai berubah dengan cepat menjadi sel lutein. Sel ini tumbuh sehingga diameternya menjadi dua atau beberapa kali lebih besar daripada sel granulosa dan terisi oleh inklusi lipid yang memberikan tampilan kekuningan. Proses ini disebut dengan luteinisasi dan masa total dari sel bersama-sama disebut sebagai korpus luteum.

2.16 Tes Penentuan Siklus Birahi mencit Betina

Persiapan *vaginal smear* antara lain meliputi :

1. Monitor siklus reproduksi dengan setiap hari melakukan *vaginal smear*
2. Timbang berat badan binatang dan lakukan *vaginal smear* pada pagi hari selama 7 hari dalam seminggu
3. Membuat catatan pada setiap binatang setiap observasi dilakukan
4. Ambil beberapa tetes salin dengan *eye dropper*, dan masukkan ke dalam vagina tikus. Hati-hati jangan sampai menyentuh cervix
5. Semprotkan cairan salin sebanyak 3 kali ke dalam vagian sambil dihisap kembali cairan tersebut.
6. Tetapkan cairan tersebut pada obyek glass untuk kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 atau 400. Gambarannya dapat dilihat pada *gambar 2.12*.

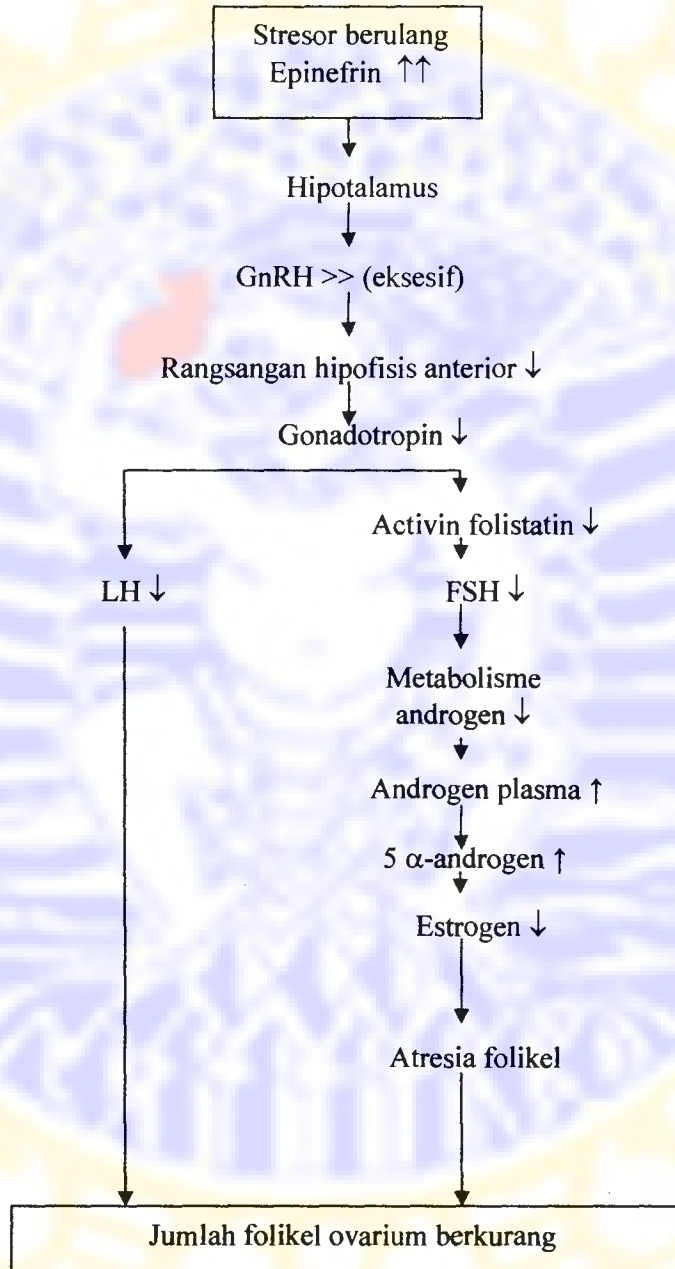


Gambar 2.12. Gambaran tipikal hapusan vagina dari beberapa tahapan pada siklus birahi tikus betina (Thompson, 1990)

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Stresor berulang dapat menyebabkan terjadinya stres. Pemberian injeksi epinefrin dosis terapeutik maksimal merupakan suatu bentuk perwakilan stresor berat yang diberikan secara berulang. Stresor ini dapat menyebabkan stres. Akibat stres adalah terjadinya pengeluaran epinefrin dan norepinefrin yang ekksesif sehingga kadar epinefrin dan norepinefrin tinggi di dalam darah (Cunningham, 2002). Peningkatan kadar epinefrin akan meningkatkan frekuensi pulsasi dan amplitudo GnRH pada hipotalamus. GnRH yang ekksesif dapat menurunkan sekresi *gonadotropin* dari hipofisis anterior yang mengakibatkan sekresi LH dan FSH menurun. Penurunan kadar FSH dapat menurunkan metabolisme androgen dan stimulasi sistem aromatase sel granulosa (GCs). Penurunan metabolisme androgen akan menurunkan pembentukan estrogen sedangkan penurunan stimulasi sistem aromatase akan menurunkan pembentukan reseptor LH sehingga pembentukan estrogen juga akan mengalami penurunan (Filicori & Cognigni, 2000; Pacak Karel & Palkovitis, 2001).

Estrogen sangat dibutuhkan untuk perkembangan dan pematangan folikel, bila kadar estrogen turun maka akan mengaktifkan enzim endonuklease. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya atresia folikel. Peningkatan jumlah atresia folikel akan menurunkan jumlah dari folikel di dalam ovarium. Disamping itu kadar LH yang turun di dalam darah juga akan menurunkan pertumbuhan folikel dan sintesis estrogen dan progesteron di dalam ovarium. Terjadinya penurunan sintesis hormon estrogen dan progesteron dapat berakibat menurunkan pertumbuhan folikel dalam ovarium mencit betina baik itu folikel primer, sekunder, tersier dan folikel De Graaf (Ganong, 2001; Speroff, 1994, Anas).

3.2 Hipotesis

Dalam kerangka konseptual yang telah dipaparkan, dirumuskan hipotesis seperti berikut :

Pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal menurunkan jumlah folikel ovarium (primer, sekunder, tersier, de Graaf) mencit betina.

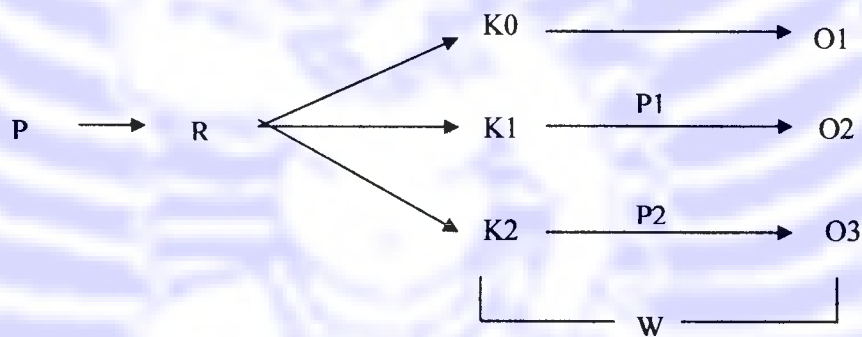
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *Posttest only Control Group Design* (Campbel, 1963).

Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



Keterangan :

P = Populasi

R = Randomisasi

K0 = Kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan (kelompok kontrol posttest)

K1 = Kelompok satu dengan pemberian injeksi subkutan NaCl 0.9 % 0,2 ml/20gram BB mencit

K2 = Kelompok dua dengan pemberian injeksi subkutan epinefrin dengan dosis terapeutik maksimal 0,001 mg/ 20 gram BB mencit

- O1 = Data *posttest* kelompok kontrol
- O2 = Data *posttest* kelompok 1 (K1)
- O3 = Data *posttest* kelompok dua (K2)
- W = Waktu perlakuan mulai awal proestrus
- P1 = Pemberian injeksi subkutan NaCl 0,9 % sebanyak 0,2 ml/20 gram BB mencit setiap jam sebanyak 5 kali injeksi melalui subkutan.
- P2 = Pemberian injeksi epinefrin dosis 0,001 mg/20 gram BB mencit (0,2 ml/20gram BB mencit) setiap jam sebanyak 5 kali injeksi melalui subkutan.

4.2 Populasi, sampel, besar sampel, dan Teknik pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi sampel penelitian ini adalah mencit yang berasal dari laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Mencit yang dipilih memenuhi persyaratan :

1. *Mus musculus*
2. Umur sekitar 2 bulan
3. Berat badan 20-30 gram
4. Jenis kelamin betina
5. Sehat
6. Mencit tidak hamil

4.2.2 Besar sampel

Sampel diambil dari populasi yang tidak terbatas (*infinit*) umur sekitar 2 bulan, terdiri dari 3 kelompok yang diambil secara acak.. Besar sampel minimal

untuk masing-masing kelompok adalah 8 ekor. Hal ini ditentukan berdasarkan rumus Steel dan Torrie (1991) dengan rumus sebagai berikut :

standar deviasi) $\tau^2/d^2 = 1$. Bila $\alpha = 0,05$ dan $\beta = 0,21$ maka diperoleh $Z\alpha = 1,645$ dan $Z\beta = 0,842$ sehingga diperoleh besar sampel minimal $n = (1,645 + 0,842)^2 \cdot (1)^2 = 6,185 = 7$

Bila penggunaan sampel masing-masing kelompok sebanyak 8 ekor maka dianggap sudah memenuhi jumlah sampel minimal. Dengan demikian maka jumlah seluruh sampel adalah : $3 \times 8 = 24$ ekor. Walaupun demikian sebagai cadangan untuk mengganti kemungkinan ada yang mati dalam penelitian ini setiap kelompok dipelihara 2 ekor sehingga jumlah total mencit sebanyak 30 ekor.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah secara *simple random sampling* (Zainuddin, 2002).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas (independen)

Variabel bebas penelitian ini adalah epinefrin

4.3.2 Variabel tergantung (dependen)

Variabel tergantung penelitian ini adalah : jumlah folikel ovarium mencit betina yaitu : folikel primer, sekunder, tersier, de Graaf

4.3.3 Variabel kendali

Variabel kendali penelitian ini meliputi : Jenis hewan coba, pakan
Kandang plastik, perawatan

4.4 Definisi Operasional Variabel

4.4.1 Waktu perlakuan

Waktu yang diperlukan untuk pemberian injeksi subkutan epinefrin dan NaCl 0,9 % pada mencit betina yaitu pada 5 jam pertama fase proestrus pada satu siklus birahi. Injeksi dilakukan satu kali setiap jam.

4.4.2 Dosis epinefrin dan NaCl 0,9 %

Adalah jumlah epinefrin yang diberikan melalui subkutan kepada mencit betina dengan dosis yang digunakan adalah : kelompok satu (K1) diberikan injeksi subkutan NaCl 0,9 % sebanyak 0,2 ml/20 gram BB mencit, kelompok dua (K2) diberikan injeksi subkutan epinefrin dengan dosis 0,001 mg/20 gram BB mencit. Dosis ini didapat dari perhitungan menyesuaikan epinefrin dari manusia ke mencit berdasarkan tabel konversi dari Laurence dan Bacharach (lampiran 3)

4.4.3 Jumlah folikel ovarium

Adalah jumlah folikel–folikel di dalam ovarium yang dilihat pada irisan melintang ovarium mencit dengan pembesaran 400x pada setiap kelompok (kontrol posttes, kelompok satu dan kelompok dua) yang meliputi : folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier dan folikel de Graaf.

1. Folikel primer terdiri dari oosit primer yang dikelilingi oleh selapis epitel pipih yang disebut sel folikuler dan berkumpul di bawah tunika albugenia.
2. Folikel sekunder terdiri dari banyak sel - sel granulosa dan terletak agak jauh dari permukaan ovarium. Sel epitel berbentuk kuboid dan mengitari oosit serta ditandai dengan perkembangan zona pelucida yang mengitari membran plasma oosit. Ovum mempunyai pembungkus tipis yang disebut membran vitelin.
3. Folikel tersier ditandai dengan pembentukan teka interna dan eksterna. Antrum sudah mulai terbentuk dibatasi oleh membran granulosa dan diisi oleh cairan folikel.
4. Folikel de Graaf merupakan folikel dewasa yang di dalamnya terdapat rongga (antrum) yang besar berisi cairan folikel, dilapisi oleh sel granulosa dan sel teka. Oosit berada pada satu sisi. Folikel ini juga ditandai dengan pembentukan membran granulosa yang membentuk suatu gundukan di sekitar ovum yang disebut kumulus ooforus (Toelihere, 1981; Hafezt, 1993).

4.4.4 Variabel Kendali

- a. Jenis hewan coba adalah tikus putih kecil/mencit / mus musculus
- b. Pakan dapat dilihat pada lampiran 7
- c. Kandang plastik dengan ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm sebagai yang terdiri dari kawat kasa sebagai penutup kandang, botol tempat air minum dengan selangnya, sekam sebagai alas kandang.

- d. Perawatan : alas tempat tidur harus dapat menyerap air dan sesering mungkin diganti atau bila tercium bau amonia dan air minum diganti setiap hari.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan penelitian

Dalam penelitian digunakan bahan yang terdiri dari :

1. Epinefrin 1 mg/ml dalam larutan 0,1 %
2. Kapas, tissue, kertas label
3. NaCl 0,9 % digunakan untuk pemeriksaan siklus birahi dengan cara ulasan vagina mencit betina dan bahan suntikan untuk kelompok satu (K1).
4. Bahan untuk teknik pewarnaan preparat histologis ovarium terdiri dari larutan formalin 10 % untuk menyimpan organ yang akan difiksasi, etanol 80 %, 95 % dan 100% untuk proses dehidrasi, paraffin cair untuk proses infiltrasi, hematoksin Eosin (HE) untuk teknik pewarnaan, alkohol, air, amonium untuk tahap diferensiasi, Xilol untuk penjernihan, balsem kanada untuk tahap mounting.

4.5.2 Instrumen penelitian

Pada penelitian ini menggunakan peralatan sebagai berikut :

1. Kandang ukuran 30 cm x 40 cm x 20 cm sebagai tempat pemeliharaan mencit yang terdiri dari kandang bak plastik, kawat kasa sebagai penutup kandang, botol tempat air minum dengan slangnya, sekam sebagai alas kandang

2. Alat melakukan ulasan vagina adalah pipet yang berujung halus
3. objek glass dan kaca penutup
4. Mikroskop cahaya binokuler + kamera
5. Sduit injeksi 1 ml
6. Seperangkat alat bedah : gunting dan pinset
7. Papan seksi untuk memfiksasi mencit yang akan dibedah
8. Stoples kecil dan tutupnya sebagai tempat penyimpanan organ ovarium
9. Seperangkat alat untuk membuat preparat histologis ovarium
10. Timbangan Torbal (*Torsion balance*)

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama tujuh hari dalam kandang Laboratorium Biokimia FK Unair yang berfungsi untuk proses adaptasi.

4.6.2 Pembagian kelompok hewan coba

Pembagian kelompok hewan coba dilakukan secara *simple random sampling*. Dengan menggunakan sistem acak. 30 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

1. Kelompok kontrol *posttest* : 10 ekor mencit pada kelompok ini diambil ovariumnya sebagai data kontrol *posttest* dengan cara pembedahan
2. Kelompok 1 : 10 ekor mencit diberi injeksi subkutan NaCl 0,9 % sebanyak 0,2 ml/20 gram BB mencit sebagai data kelompok satu *posttest*.
3. Kelompok 2 : 10 ekor mencit diberi injeksi subkutan epinefrin 0,001 mg/20 gram BB mencit sebagai data kelompok dua *posttest*.

4.6.3 Penimbangan berat badan

Penimbangan berat badan mencit menggunakan timbangan Torbal (Torsion Balance) dengan ketelitian satu angka di belakang koma yang dilakukan :

1. Pada semua kelompok dilakukan penimbangan yang pertama kali.
2. Penimbangan berat badan setiap hari untuk menentukan besar dosis yang diberikan kepada hewan coba.

4.6.4 Pemeriksaan siklus birahi

1. Setelah mencit betina diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian dilakukan pemeriksaan ulas vagina selama 10 hari (dua kali siklus birahi). Setiap harinya dilakukan pemeriksaan 4 kali (setiap 6 jam). Setelah didapatkan siklus birahi yang teratur dari mencit betina kemudian pada fase proestrus dilakukan penyuntikan epinefrin dan NaCl 0,9 % dengan dosis 0,001 mg/20 gram BB mencit, kemudian pada fase akhir estrus dilakukan pengambilan ovarium mencit betina.

Cara pemeriksaan :

Pemeriksaan siklus birahi dapat dilakukan dengan membuat ulasan vagina dengan menggunakan pipet yang berujung halus dan diisi dengan NaCl 0,9% 2-3 tetes, kemudian cairan tersebut disemprotkan ke dalam vagina mencit lalu dihisap kembali, dilakukan sebanyak tiga kali. Cairan yang dihisap tadi sudah mengandung sel-sel dari vagina kemudian ditetaskan di atas *objek glass* dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 sampai 400 kali, diamati ada tidaknya sel-sel berinti dan bertanduk (Lie dan Chi, 1985). Pada ulasan mukosa vagina, fase proestrus ditandai dengan sel epitel berinti. Pada fase

estrus hanya terlihat sel-sel bertanduk dengan jumlah yang dominan, sedangkan pada fase metestrus terdapat leukosit dengan jumlah banyak dan sedikit sisa sel yang menanduk. Hal ini berbeda dengan fase diestrus dimana fase ini memiliki sel leukosit berjumlah banyak sedangkan epitel berinti sangat sedikit (Hafez, 1970).

2. Selama injeksi epinefrin dan NaCl 0.9 % dilakukan ulas vagina setiap 4 jam sekali untuk memantau awal fase estrus dan akhir dari fase estrus.
3. Akhir fase estrus dilakukan pembedahan untuk pengambilan ovarium pada mencit yang telah mendapat perlakuan seperti di atas.

4.6.5 Pembiusan

Pembiusan dilakukan dengan menggunakan ether dalam stoples pembiusan setelah mencit berada pada akhir fase estrus yang ditandai dengan sel-sel bertanduk berjumlah banyak. Kurang lebih 2 menit mencit sudah tidak bergerak yang ditandai dengan mata midriasis dan tertutup, anggota badan tidak bergerak dan mati.

4.6.6 Pembedahan

Pembedahan diawali dengan pembiusan kemudian hewan coba ditelentangkan di atas papan seksi dan keempat anggota gerak di fiksasi. Lakukan insisi dengan membuka dinding abdomen yang dimulai dari vagina menuju ke arah perut dengan menggunakan gunting kecil. Selanjutnya dicari ovariumnya dikeluarkan dan dimasukkan kedalam botol yang berisi formalin 10 % dan ditutup untuk diproses menjadi preparat histologis dan pewarnaan (prosedur pembuatan preparat histologis tercantum pada lampiran 2). Botol yang berisi potongan ovarium diberi label identitas sampel.

4.6.7 Pengamatan

Pengamatan pada penelitian ini dilakukan oleh peneliti dengan bantuan gambar 2.11. Kedua ovarium diambil dan kemudian dibuatkan preparat histologis di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo. Hasil histologi ovarium kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali atau 400 kali guna melihat jumlah folikel ovarium mencit yang meliputi folikel primer, sekunder, tersier, De Graaf.

1. Folikel primer terdiri dari oosit primer yang dikelilingi oleh selapis epitel pipih yang disebut dengan sel folikuler dan berkumpul di bawah tunika albugenia.
2. Folikel sekunder terdiri banyak sel-sel granulosa dan terletak agak jauh dari permukaan ovarium. Sel epitel berbentuk kubis dan mengitari oosit serta ditandai dengan perkembangannya zona pelusida yang mengitari membran plasma oosit. Ovum mempunyai pembungkus tipis yang disebut membran vitelin.
3. Folikel tersier ditandai dengan pembentukan teka eksterna dan interna. Antrum sudah mulai terbentuk dibatasi oleh membran granulosa dan diisi oleh cairan folikel.
4. Folikel de Graaf merupakan folikel tersier yang hampir mengalami ovulasi. Rongga terisi penuh oleh cairan yang dinamakan antrum folikuli. Oosit berada pada satu sisi. Folikel ini juga ditandai dengan pembentukan membran granulosa yang membentuk suatu gundukan di sekitar ovum yang disebut kumulus ooforus (Toilehere, 1981; Priedkalns, 1992; Hafez, 1993).

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 1 bulan mulai akhir Agustus sampai akhir bulan September 2004 di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Patologi Anatomi dan GRAMIK (Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran).

4.8 Teknik Analisa Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dianalisa dengan menggunakan:

1. Uji statistik deskriptif
2. Uji normalitas distribusi

Dilakukan pada semua kelompok baik *kelompok kontrol posttest* dan *posttest* kelompok kontrol dan perlakuan. Berguna untuk mengetahui data berdistribusi normal

3. Uji Homogenitas

Uji ini untuk menentukan apakah data varians homogen atau heterogen

4. Uji Manova (*Multivariat Anova*)

Uji yang digunakan untuk penelitian yang memiliki variabel dependent lebih dari satu dengan grup satu atau lebih dari satu (Santoso,2004).

5. Uji beda nyata kecil (BNT) 5 % untuk membandingkan perlakuan tersebut diantara masing-masing kelompok.

Semua uji di atas diolah dengan menggunakan komputer program SPSS v.10.0.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

Data penelitian diolah dengan menggunakan program komputer SPSS v 10.0. yang meliputi : deskripsi rata-rata dan standar deviasi jumlah folikel ovarium, uji normalitas, uji homogenitas, uji Manova, dan uji LSD, yang dapat digambarkan sebagai berikut.

5.1.1 Deskripsi rata-rata dan standar deviasi jumlah folikel ovarium

Tabel 5.1 Nilai rerata dan standar deviasi jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf ovarium menciut betina untuk semua kelompok

| Folikel Ovarium | Kontrol posttest | | Kelompok satu (Injeksi NaCl 0.9 %) | | Kelompok dua (Injeksi Epinefrin) | |
|------------------|------------------|--------|--|--------|--|--------|
| | \bar{X} | SD | \bar{X} | SD | \bar{X} | SD |
| Folikel Primer | 18.2 | 5.7116 | 15.9 | 3.5418 | 14.9 | 3.4464 |
| Folikel Sekunder | 10.3 | 4.9677 | 9.9 | 2.4698 | 7.1 | 4.3321 |
| Folikel Tersier | 7.8 | 4.1580 | 4.9 | 1.7920 | 4.5 | 1.5811 |
| Folikel De Graaf | 6.1 | 1.4491 | 3.7 | 1.3375 | 1.0 | 0.8165 |

5.1.2 Uji Normalitas

Untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis tersebut berdistribusi normal atau tidak, maka dilakukan uji normalitas. Bila $p > 0.05$ atau $D_{hitung} < D_{tabel}$ berarti data berdistribusi normal, sebaliknya bila $p < 0.05$ atau $D_{hitung} > D_{tabel}$ berarti data tidak berdistribusi normal (Santoso,2004; Sugiono,2001). Pengujian ke empat variabel *dependent* yaitu folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graaf untuk ovarium menunjukkan nilai signifikansi $p > 0,05$ dan $D_{hitung} > D_{tabel}$

(0.248) berarti folikel primer, sekunder, tersier dan De Graaf ovarium kanan dan kiri berdistribusi normal. Dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.2 Uji kolmogorov-smirnov Z data ovarium mencit betina pada semua Kelompok perlakuan dan kontrol

| Ovarium | Keterangan | Jenis Folikel | | | |
|---------|------------|---------------|----------|---------|----------|
| | | Primer | Sekunder | Tersier | De Graaf |
| | D | 0.154 | 0.104 | 0.232 | 0.145 |
| | P | 0.479 | 0.901 | 0.079 | 0.555 |

Ket D = Selisih frekuensi kumulatif yang terbesar (maksimum)/nilai absolut

p = Nilai signifikansi

Pengujian ke empat variabel *dependent* yaitu folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graaf untuk ovarium menunjukkan nilai signifikansi $p > 0,05$ dan $D_{hitung} > D_{tabel}$ (0.248) sehingga H_0 diterima yang berarti folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf ovarium mencit betina berdistribusi normal.

5.1.3 Uji Homogenitas

Menggunakan *Levene Test* untuk menentukan varians folikel ovarium mencit betina homogen atau heterogen, bila nilai $p > 0,05$ berarti bahwa varian menunjukkan hasil yang homogen (Santoso, 2004). Uji ini menggunakan program SPSS v .10. yang dapat dilihat pada tabel di bawah ini .

Tabel 5.3 Tes *levene ovarium* pada kelompok perlakuan dan kontrol Mencit Betina

| Ovarium | Keterangan | Jenis Folikel | | | |
|---------|------------|---------------|----------|---------|----------|
| | | Primer | Sekunder | Tersier | De Graaf |
| | Levene | 0.706 | 1.400 | 13.342 | 1.987 |
| | P | 0.502 | 0.264 | 0.000 | 0.157 |

Dari hasil uji homogenitas varian-varians folikel ovarium (folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graaf) didapatkan 3 varian (folikel primer, sekunder dan de Graaf) dengan nilai $p > 0,05$ dan 1 varian (folikel tersier) dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini berarti walaupun terdapat 1 variabel yang memiliki nilai signifikan dibawah 0,05 namun secara keseluruhan (gabungan) yang bisa dilihat pada Box's M (Santoso,2004) pada lampiran 11 menunjukkan bahwa nilai $p > 0,05$ yaitu $p = 0,085$, sehingga dapat disimpulkan bahwa varian folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf adalah homogen.

5.1.4 Uji Manova (*Multivariat Anova*)

Uji Manova menggunakan analisis Pillai Trace, Wilk Lambda, Hotelling Trace, Roy's dan F test yang digunakan untuk mengetahui rata-rata vektor yang digambarkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.4 Uji manova folikel ovarium mencit betina pada kelompok kontrol dan perlakuan

| Ovarium | Keterangan | Alat Analisis | | | |
|---------|------------|----------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| | | Pillai's Trace | Wilks' Lambda | Hotelling's Trace | Roy's Largest Root |
| | F | 4.873 | 7.357 ^a | 10.262 | 21.611 ^b |
| | P | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Hasil uji menunjukkan semua signifikan untuk keempat test menunjukkan angka dibawah 0.05. Hal ini berarti pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal menurunkan jumlah folikel ovarium (folikel primer, sekunder, tersier, de Graaf) mencit betina

Tabel 5.5 Uji anova folikel ovarium mencit betina pada kelompok kontrol dan perlakuan

| Ovarium | Keterangan | Jenis Folikel | | | |
|---------|------------|---------------|----------|---------|----------|
| | | Primer | Sekunder | Tersier | De Graaf |
| | F | 1.506 | 1.841 | 4.230 | 42.871 |
| | P | 0.240 | 0.178 | 0.025 | 0.000 |

5.1.5 Uji BNT /LSD

Tujuan untuk melihat apakah ada perbedaan yang nyata antara masing – masing variabel diantara kelompok akibat adanya perlakuan pemberian injeksi epinefrin berulang dengan dosis terapeutik maksimal.

Tabel 5.6 Uji BNT folikel ovarium mencit betina pada kelompok kontrol dan perlakuan

| Folikel ovarium | Kelompok yang dibandingkan | | p |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------|
| Folikel Primer | Kontrol posttest | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | 0.249 |
| | Kontrol posttest | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.102 |
| | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.612 |
| Folikel Sekunder | Kontrol posttest | Kontrol (Injeksi NaCl 0.9%) | 0.827 |
| | Kontrol posttest | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.090 |
| | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.135 |
| Folikel Tersier | Kontrol posttest | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | 0.027 |
| | Kontrol posttest | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.013 |
| | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | Kelompok dua Injeksi epinefrin | 0.749 |
| Folikel De Graaf | Kontrol posttest | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | 0.000 |
| | Kontrol posttest | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.000 |
| | Kelompok Satu (Injeksi NaCl 0.9%) | Kelompok dua (Injeksi epinefrin) | 0.000 |

5.2 Analisis dan Hasil Penelitian

Untuk mengetahui apakah pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik berulang berpengaruh terhadap penurunan jumlah folikel ovarium mencit betina

maka dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap rata-rata jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graaf. Perhitungan jumlah folikel dilakukan pada ovarium sebelah kanan dan kiri yang dipandu dengan atlas dari Hafez (1970) dan gambar 2.11, distribusi ini dapat dilihat pada tabel 5.1.

5.2.1 Jumlah Folikel Primer

Hasil perhitungan jumlah folikel primer pada ovarium mencit betina pada kelompok kontrol posttest, kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dan kelompok 2 (injeksi epinefrin) pada setiap jam sebanyak 5 kali pada awal fase proestrus yang distribusi statistiknya disajikan pada tabel 5.1

Dari hasil *Manova Output Between subject* pada lampiran 11 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) akibat pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap penurunan jumlah folikel primer ovarium mencit betina yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,240$.

Hasil uji BNT didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) jumlah folikel primer antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) yang memiliki nilai $p = 0,249$ dan antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,102$ serta antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dengan $p = 0,612$

5.2.2 Jumlah Folikel Sekunder

Hasil perhitungan jumlah folikel sekunder pada ovarium mencit betina pada kelompok kontrol posttest, kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dan kelompok 2 (injeksi epinefrin) pada setiap jam sebanyak 5 kali pada awal fase proestrus yang distribusi statistiknya disajikan pada tabel 5.1

Dari hasil Manova *Output Between subject* pada lampiran 11 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) akibat pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap penurunan jumlah folikel sekunder ovarium mencit betina yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,178$.

Hasil uji BNT didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) jumlah folikel sekunder antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 1 (NaCl 0,9 %) yang memiliki nilai $p = 0,827$ dan antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,090$ serta antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dengan $p = 0,135$

5.2.3 Jumlah Folikel Tersier

Hasil perhitungan jumlah folikel tersier pada ovarium mencit betina pada kelompok kontrol posttest, kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dan kelompok 2 (injeksi epinefrin) pada setiap jam sebanyak 5 kali pada awal fase proestrus yang distribusi statistiknya disajikan pada tabel 9.1

Dari hasil Manova *Output Between subject* pada lampiran 11 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) akibat pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap penurunan jumlah folikel tersier ovarium mencit betina yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,025$.

Hasil uji BNT didapatkan bahwa ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) jumlah folikel tersier antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) yang memiliki nilai $p = 0,027$ dan antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,013$, namun tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) jumlah folikel tersier kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,749$.

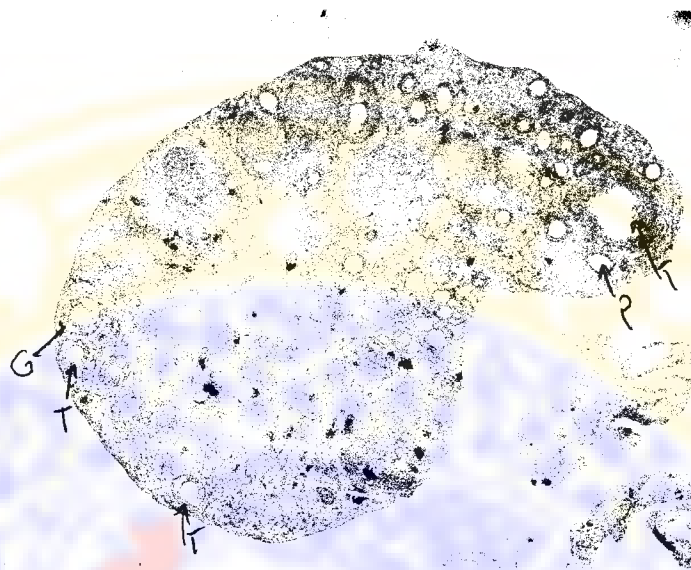
5.2.4 Jumlah folikel de Graaf

Hasil perhitungan jumlah folikel de Graaf pada ovarium mencit betina pada kelompok kontrol posttest, kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dan kelompok 2 (injeksi epinefrin) pada setiap jam sebanyak 5 kali pada awal fase proestrus yang distribusi statistiknya disajikan pada tabel 5.1

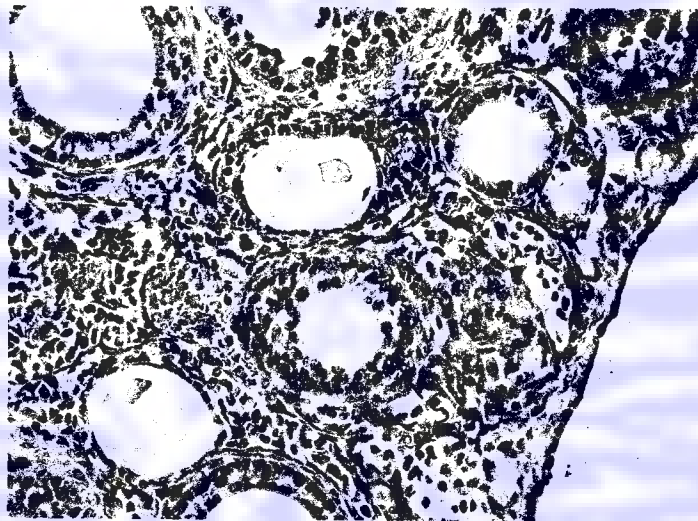
Dari hasil Manova *Output Between subject* pada lampiran 11 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) akibat pemberian berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap penurunan jumlah folikel de Graaf ovarium mencit betina yang ditunjukkan dengan nilai $p = 0,000$.

Hasil uji BNT juga didapatkan ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) jumlah folikel de Graaf antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) yang memiliki nilai $p = 0,000$ dan antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,000$, serta antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dengan nilai $p = 0,000$

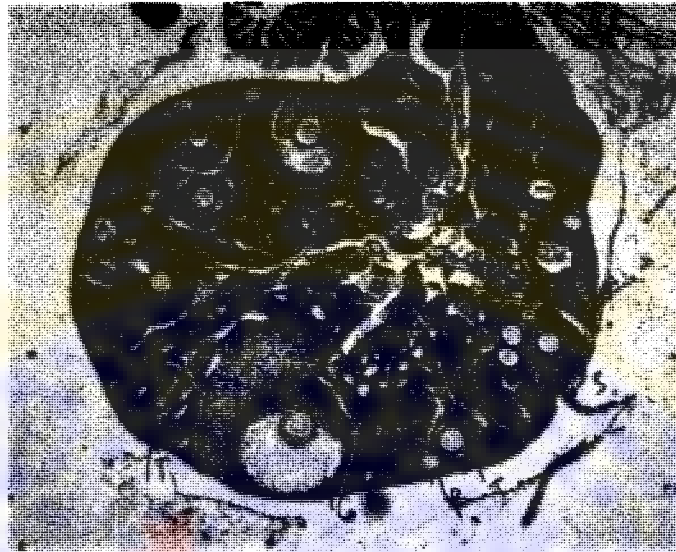
Disajikan pada tabel 5.5.



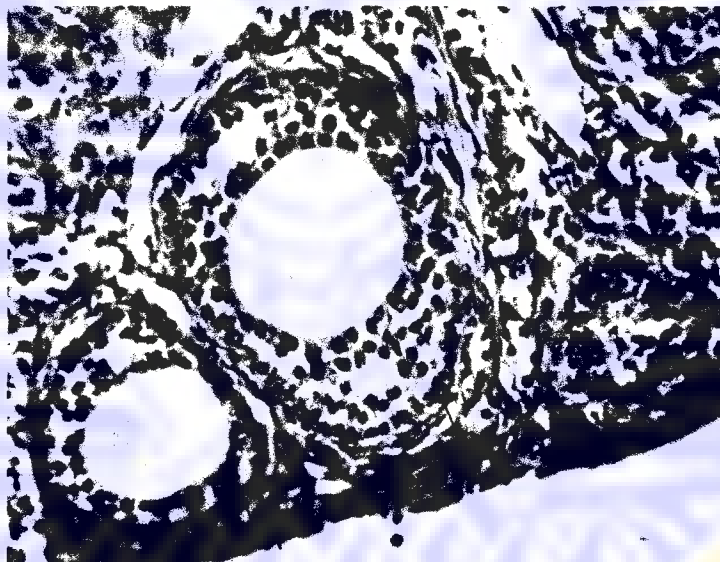
Gambar 5.1 Irisan melintang ovarium menciit pada kelompok kontrol posttest dengan pembesaran 40X yang memperlihatkan folikel sekunder, tersier, de Graaf



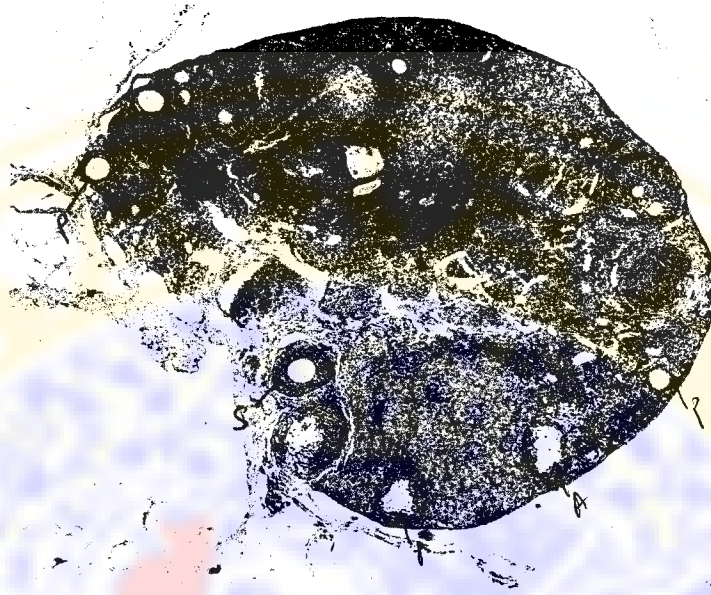
Gambar 5.2 Irisan melintang ovarium menciit pada kelompok kontrol posttest dengan pembesaran 400X yang memperlihatkan folikel primer dan sekunder



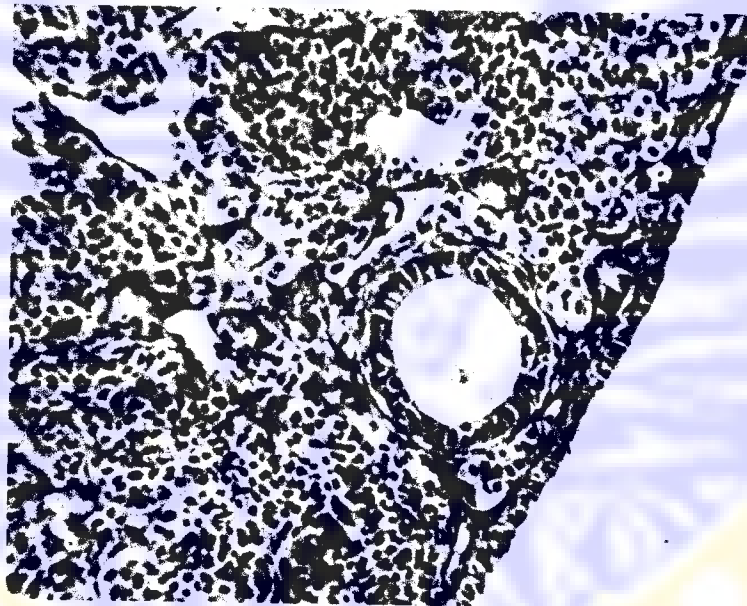
Gambar 5.3 Irisan melintang ovarium mencit pada kelompok injeksi NaCl 0.9 % dengan pembesaran 40X yang memperlihatkan folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf



Gambar 5.4 Irisan melintang ovarium mencit pada kelompok injeksi NaCl 0.9 % dengan pembesaran 400X yang memperlihatkan folikel tersier dan sekunder



Gambar 5.5 Irisan melintang ovarium mencit pada kelompok injeksi epinefrin dengan pembesaran 40X yang memperlihatkan folikel primer, sekunder, tersier dan folikel atresia (A)



Gambar 5.6 Irisan melintang ovarium mencit pada kelompok injeksi epinefrin dengan pembesaran 400X yang memperlihatkan folikel primer

BAB 6**PEMBAHASAN****6.1 Pemberian Injeksi NaCl 0,9 % pada Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina**

Hasil penelitian tentang pemaparan berulang larutan fisiologis NaCl 0.9 % menunjukkan bahwa jumlah folikel primer, sekunder ovarium mencit betina tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p>0,05$) antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok satu yang mendapat injeksi NaCl 0.9 % dan antara kelompok yang mendapat injeksi NaCl 0.9 % dengan kelompok yang mendapat injeksi epinefrin. Sedangkan folikel tersier menunjukkan ada perbedaan ($p<0,05$) yang nyata antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dengan $p=0,027$, begitu juga halnya dengan folikel de Graaf dengan $p=0,000$.

Persamaan jumlah folikel primer dan sekunder akibat pemaparan berulang injeksi NaCl 0.9 % menunjukkan bahwa stresor fisik akibat injeksi NaCl 0.9 % belum cukup untuk memberikan pengaruh terhadap penurunan kadar FSH sehingga folikel masih dapat tumbuh dari folikel primer ke sekunder. Sejalan dengan yang dikemukakan oleh Sukra,dkk (1989) bahwa *folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang dihasilkan oleh sel-sel basofil dari kelenjar hipofisa anterior menyebabkan folikel tumbuh, sehingga ovarium berfungsi pada waktu dewasa kelamin. Syahrums (1994) menambahkan bahwa FSH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior menginduksi ovarium dan folikel-folikel yang lebih muda untuk berkembang. Disamping itu Ganong (2001) menyebutkan juga bahwa pada fase

folikuler, kadar inhibin turun yang diikuti dengan FSH meningkat, sehingga mendorong pertumbuhan folikel.

Jumlah folikel tersier dan de Graaf ovarium menunjukkan penurunan jumlah. Hal ini jelas menunjukkan bahwa stres fisik berupa suntikan subkutan berulang selama awal fase proestrus dapat menurunkan kadar FSH dan LH sehingga untuk proses pematangan folikel dari sekunder ke tersier dan ke folikel de Graaf mengalami gangguan. Sesuai dengan yang disampaikan Pacak Karel & Palkovitis (2001) bahwa Stres akut dapat menstimulasi peningkatan androgen yang diakibatkan oleh penurunan metabolisme androgen bukan karena gangguan pada pelepasan androgen. Penurunan metabolisme androgen dapat menurunkan kadar estrogen didalam darah dimana estradiol ini sangat berperan didalam peningkatan aktivasi dari FSH dan kelangsungan pertumbuhan folikel pada tahap berikutnya (Cunningham,2000). FSH juga berperan menstimulasi sistem aromatase sel granulosa (GCs) untuk membentuk reseptor LH, hal ini difasilitasi oleh estrogen. LH yang terbentuk berperan dalam meningkatkan pertumbuhan folikel preovulatori (tersier dan de Graaf) (Filicori & Cognigni,2000; Pacak Karel & Palkovitis, 2001). Penurunan kadar FSH kemungkinan disebabkan karena katekolamin (epinefrin) yang dihasil oleh stimulasi akibat stresor fisik dapat mengaktifkan sistem saraf simpatis untuk melepaskan neurotransmitter norepinefrin lokal pada ujung saraf simpatis postganglionik, sedangkan stresor pada medula merangsang pelepasan epinefrin ke sirkulasi (Norman Antony,1987). Katekolamin ini meningkatkan frekuensi dan amplitudo GnRH sehingga proses pematangan folikel sekunder ke tersier pada ovarium mengalami gangguan (Guyton,2000; Speroff,1994).

6.2 Pemberian Injeksi Epinefrin Dosis Terapeutik Maksimal pada Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina

Hasil penelitian tentang pemaparan berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal menunjukkan bahwa jumlah folikel primer, sekunder ovarium mencit betina tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 yang mendapat injeksi epinefrin dengan nilai $p = 0,102$ untuk folikel primer dan $p = 0,090$ untuk folikel sekunder. Sedangkan folikel tersier menunjukkan ada perbedaan ($p < 0,05$) yang nyata antara kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 yang mendapat injeksi epinefrin dengan $p = 0,013$. Ada perbedaan ($p < 0,05$) yang nyata antara jumlah folikel de Graaf kelompok kontrol posttest dengan kelompok 2 (injeksi epinefrin) dengan nilai $p = 0,000$.

Masih ditemukan persamaan jumlah folikel primer dan sekunder akibat pemaparan berulang injeksi epinefrin menunjukkan bahwa stresor fisik akibat injeksi dan stresor kimiawi berupa epinefrin masih belum cukup untuk memberikan pengaruh terhadap penurunan kadar FSH sehingga folikel masih dapat tumbuh dari folikel primer ke sekunder. Sejalan dengan yang dikemukakan oleh Sukra,dkk (1989) bahwa *folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang dihasilkan oleh sel-sel basofil dari kelenjar hipofisa anterior menyebabkan folikel tumbuh, sehingga ovarium berfungsi pada waktu dewasa kelamin. Syahrums (1994) menambahkan bahwa FSH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior menginduksi ovarium dan folikel-folikel yang lebih muda untuk berkembang. Disamping itu Ganong (2001) menyebutkan juga bahwa dari fase folikuler, kadar inhibin turun yang diikuti dengan FSH meningkat, sehingga mendorong pertumbuhan folikel.

Jumlah folikel tersier dan De Graaf ovarium menunjukkan penurunan jumlah. Hal ini jelas menunjukkan bahwa pemberian stres fisik berupa suntikan subkutan dan stres kimiawi berupa injeksi epinefrin berulang selama awal fase proestrus dapat menurunkan kadar FSH sehingga untuk proses pematangan folikel dari sekunder ke tersier dan ke folikel de Graaf mengalami penurunan. Dari hasil pengamatan ditemukan banyak folikel yang mengalami atresia. Penurunan kadar FSH kemungkinan disebabkan karena katekolamin (epinefrin) yang dihasilkan oleh stimulasi akibat stresor fisik dan epinefrin dari eksogen (Norman Antony, 1987). Peningkatan kadar epinefrin dalam sirkulasi akibat injeksi epinefrin dari luar yang merupakan perwakilan dari stres berat ternyata dapat mengakibatkan penurunan sekresi gonadotropin (LH dan FSH). Hal ini disebabkan karena katekolaminergik (epinefrin) bekerja dengan meningkatkan dan merubah frekwensi rangsangan dan amplitudo GnRH. Kenaikan frekwensi pulsasi GnRH dan peningkatan amplitudo dapat menurunkan dan menghentikan sekresi *gonadotropin (Down Regulation reseptor GnRH)* (Speroff, 1994; Stefen dan Florian, 2000). Penghentian dan hilangnya lonjakan *gonadotropin* akan memicu dan mempercepat terjadinya atresia folikel (Annas, 2004). Stres akut dapat menstimulasi peningkatan androgen yang diakibatkan oleh penurunan metabolisme androgen bukan karena gangguan pada pelepasan androgen (Pacak Karel & Palkovitis (2001). Androgen mempunyai sifat atretogenik terhadap folikel yang menyebabkan banyak terjadi piknotik sel granulosa dan degenerasi sel oosit. Pada konsentrasi tinggi akan di metabolisme oleh sel granulosa menjadi 5α -androgen yang merupakan androgen sangat poten dimana androgen ini tidak bisa dirubah menjadi estrogen dan menghambat pembentukan reseptor LH yang

essensial untuk pertumbuhan folikel serta menghambat aktifitas aromatase. Dengan demikian bila rasio androgen-estrogen meningkat akan memicu proses apoptosis folikel (Annas, 2004). Sehingga proses pematangan folikel dari sekunder ke tersier dan sampai ke folikel De Graaf mengalami penurunan (Guyton,2000;Speroff,1994). Seiring yang disampaikan oleh Vries,dkk,2001 bahwa penurunan kadar FSH akan berakibat pada meningkatnya kelompok oksidatif radikal bebas di dalam sel –sel granulosa. Lebih lanjut dikatakan bahwa meningkatnya kelompok oksidatif radikal bebas didalam sel –sel granulosa akan mengaktifkan endonuklease yang dapat menyebabkan kematian sel pada folikel. Kematian sel akan menghambat ovulasi (ICBS,2000). Berdasarkan penjelasan ini diduga menurunnya jumlah folikel akibat pemberian epinefrin disebabkan oleh kematian sel (atresia folikel) sehingga folikel De Graaf yang terbentukpun mengalami penurunan jumlah. akibatnya jumlah folikel yang diovulasipun berkurang atau mungkin tidak terjadi.

6.3. Perbandingan Pemberian NaCl 0,9 % Dosis Terapeutik Maksimal dengan Pemberian Epinefrin pada Jumlah Folikel Ovarium Mencit Betina

Hasil penelitian tentang pemaparan berulang injeksi NaCl 0,9 % dan pemberian epinefrin dosis terapeutik maksimal menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) antara jumlah folikel primer ($p = 0,612$) , sekunder ($p = 0,135$) dan tersier ($p = 0,749$) kelompok 1 yang diberi injeksi NaCl 0,9 % dengan kelompok 2 yang diberi injeksi epinefrin. Sedangkan jumlah folikel de Graaf antara kelompok 1 dengan 2 menunjukkan ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dengan $p = 0,000$. Pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata dan standar

deviasi jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graaf mengalami penurunan mulai dari kelompok kontrol posttest, kelompok 1 (injeksi NaCl 0,9 %) dan kelompok 2 (injeksi epinefrin).

Hal ini menunjukkan bahwa semakin berat stres yang diwakili dengan pemberian injeksi subkutan epinefrin dosis maksimal menunjukkan rerata jumlah folikel semakin menurun. Peningkatan hormon stress dan katekolamin dapat mengganggu pulsatil GnRH dalam hal frekuensi dan amplitudo. Peningkatan frekuensi dan amplitudo ini dapat menurunkan atau menghentikan sekresi dari *gonadotropin (Down Regulation reseptor GnRH)* (Speroff,1994; Stefan dan Florian,2000). Stresor merupakan faktor yang sangat kuat dalam mempengaruhi *gonadal axis* karena pada kondisi ini akan terjadi peningkatan *Corticotropin Releasing Hormone (CRF)* dan β -endorfin pada hipotalamus yang menghambat gonadotropin, oxytocin dan vasopressin (Laatikaine.T.J,1991).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang pemberian injeksi epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap jumlah folikel ovarium (primer, sekunder, tersier, De Graaf) dapat disimpulkan seperti dibawah ini :

1. Pemberian injeksi berulang NaCl 0.9% tidak secara bermakna mengakibatkan menurunkan jumlah folikel primer dan sekunder pada ovarium mencit betina.
2. Pemberian injeksi berulang epinefrin dosis terapeutik maksimal dan NaCl 0,9 % secara bermakna menurunkan jumlah folikel tersier, tapi tidak ada perbedaan secara bermakna antara pemberian injeksi berulang NaCl 0,9 % dan epinefrin dosis terapeutik maksimal.
3. Pemberian injeksi berulang NaCl 0,9 % dan epinefrin dosis terapeutik maksimal secara bermakna menurunkan jumlah folikel de graaf ovarium namun pengaruh epinefrin dosis terapeutik maksimal secara bermakna lebih kuat dibandingkan dengan NaCl 0,9 %.

7.2 Saran

Atas dasar hasil penelitian tentang pengaruh pemberian epinefrin dosis terapeutik maksimal terhadap jumlah folikel ovarium maka peneliti perlu menyarankan :

1. Dilakukan penelitian serupa untuk jangka waktu lama/stres kronis (beberapa siklus birahi) yang disertai dengan pengukuran kadar kortisol maupun FSH dan LH guna melihat pengaruh lebih lanjut terhadap proses folikulogenesis.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat pengaruh stres terhadap kadar *growth hormone, prolactin, dan tiroid stimulating hormone*

DAFTAR PUSTAKA

- Annas JY, 2004. Umur dan Sistem Reproduksi Wanita. Lab SF Ilmu Kebidanan dan Penyakit Kandungan, FK Unair-RSU Dr Soetomo Surabaya. pp.5-6
- Baron S and Brush R, 1979. Effects of acute and chronic restraint, and estrous cycle on pituitary-adrenal function in the rat. *Horm. Behav.* 12 : 218-224.
- Bonen A, 1994. Exercise – induced menstrual cycle change. A functional, temporary adaptation to metabolic stress. *Sport Med* 17: 373-392.
- Chiueh CC and McCarty R, 1981. Sympatho-adrenal hyperreactivity to footshock stress but not to cold exposure in spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Behav.* 26 : 85-89.
- Cunningham JG, 2002. *Textbook of Veterinary Physiology*, 3rd edition. WB. Saunders Company. Philadelphia pp : 356-357.
- Edward L, Fox L, Bowers RW, Merle L, 1993. *The Physiological basis for exercise & Sport*, 5th. Brown and Benchmark pp : 601.
- Erickson GF, 1986. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in reproductive endocrinology*. pp1-10.
- Filicori Marco and Cognigni Graciela E, 2000. Roles and Novel Regimen of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Ovulation Induction, *Reproductive Endocrinology Center, Bologna, Italy*. pp:1437
- Fox RR & Laird CW, 1970. *Sexual Cycles In: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed) Lea & Febiger, Philadelphia.
- Ganong WF, 2001. *Review Of Medical Physiology*, 20th ed. Appleton and Large, Stanford, Connecticut, pp : 414-423.
- Griffin FJT, 1989. Stress and Immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 20 : 41-48.
- Greenspan F, 1997. *Basic and clinical endocrinology*, 5th ed. Appleton and Large, Stanford Connecticut, pp 545-567.
- Guyton AC, 2000. *Textbook of Medical Physiology*, 10th ed. West Washington Square: WB Saunders Company pp :1284-1298.

- Hafez ESE, 1970. **Female Reproductive Organs**. In: **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals**. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Hafez ESE, 1993. **Reproduction in farm animals**. Edisi 6. Philadelphia : Lea dan Febiger, pp114-120.
- Harjopranto S, 1995. **Ilmu Kemajiran pada ternak**. Surabaya : Airlangga University Press, hlm 170-171.
- Hedge GA, Colby HD, Goodman RL, 1987. **Clinical Endocrine Physiology**. Philadelphia. WB Saunders. Pp : 300.
- Hill M, 1997. **Mamalian sexual cycles : The Estrous Cycle**. Science embryology 5 : hal 1-4.
- Hebel R. & Stromberg MW, 1976. **Anatomy of the laboratory rat**. William & Wilkins, Baltimore.
- http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8304/lab_companion/HistoPath/VM8054/LABS/Lab28/EXAMPLES/EXPRMFOL.HTM Februari 2005
- Ismudiono, 1999. **Fisiologi reproduksi pada ternak**. Edisi 2, Surabaya : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, hlm 70-79.
- Smith B dan Mangkoewidjojo S, 1988. **Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis**. Edisi 1, UI Press; Universitas Indonesia hlm 11-24.
- Kusumawati D, 2003. **Bahan Ajar tentang HEWAN COBA**, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, pp 11-2,22,67,87.
- Laatikainen TJ, 1991. **Corticotropin-releasing hormone and peptides in reproduction and stress**. ann med 23 (5) : 489-496.
- Mansjoer A, Triyanti K, Savitri R, Wardhani WI, Setiowulan L, 1999. **Kapita Selekta Kedokteran**. Media Aesculapius, Jakarta.
- Norman AW, Litwack G, 1987. **Hormone**. Academic Press, Inc, San Diego New York boston, 450-469.
- Pacak karel and Polkovits, 2001. **Stressor specificity of Central Neuroendocrine Responses Implication for Stress-Related Disorder**. Endocrine Society. pp.534

- Partodihardjo S, 1980. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta : Penerbit Mutiara.
- Prendergast, Herasherzig A, and Dalakin A, 2002. GnRH-Gonadotrophin physiology and pathology.
- Robinovici J, 1993. The differential effects of FSH and LH on the human ovary. *Bailliere's Clin Obstet Gyneecol* 7(2):263-281.
- Ross MH, 2000. *Histology A Text and Atlas 3rd Ed.* p. 681 Fig. 22.3.
- Santoso S, 2004. *Buku latihan SPSS Statistik Parametrik.* Elex media Komputindo, edisi 4. Gramedia Jakarta.
- Speroff L, Glass RH, Kase NG, 1994. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 5th ed, Willians and Wilkins.
- Steel RGD, Torrie J, 1991. *Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik.* Alih bahasa Bambang Sumantri, Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama, hlm 51-62.
- Sugiyono, Wibowo E, 2001. *Statistik Penelitian dan aplikasinya dengan SPSS 10.0 for windows*, Alfabeta. Bandung.
- Stefan S, Lang L , 2000. *Color Atlas of Pathophysiology.* New York, pp 274-275.
- Sukra Y, Rahardja L, Djuwit I, 1989. *Embriologi I.* Bogor: Institut Pertanian Bogor, hlm 38-42.
- Syahrum MH, Kamaludin, dan Tjokronegoro A, 1994. *Reproduksi dan Embriologi dari Satu Sel menjadi Organisme.* Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 39-45.
- Thomson AJM, Gazvani MR, Wood SJ, Meacock SC, Jonesm DIL, and Kingsland CR, 2001. *Comparison of Ovarian respon in Right and Left Ovaries in IVF Patients.* *Human Reproduction* 16: pp 237-239.
- Toelihere MR, 1979. *Fisiologi reproduksi pada ternak.* Bandung : Penerbit Angkasa Bandung. Hlm : 133-266.
- Turner CD, Bagnara JT, 1976. *General endocrinology.* W.B Saunders. Co. pp 449-642.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, 2001. *Human Physiology, The Mechanism of Body Function,* McGraw Hill, Boston Burr Ridge, IL Dubuque, IA.

- Viau V, and Meaney MJ, 1991. Variations in hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* (Baltimore), 129(5) : 2503-2511.
- Vries E, Tonkelaar ID, Noord PAHV, Schouw YTV, Velde ER and Peeters PHM, 2001. Oral contraceptive use in relation to age at menopause in the DOM cohort. *Human Reproduction*. 16:1657-1662
- Yatim W, 1994. *Reproduksi dan Embriologi*. Edisi 2, Bandung : Penerbit Tersito . Bandung, hlm 104.
- Young WC, Boling JL & Blandau RJ, 1941. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.*, 80:37.
- Zainuddin M, 2000. *Metodologi penelitian*, Surabaya : Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, hlm 54-56.

Lampiran 1.**Perhitungan dosis epinefrin****1. Perhitungan dosis epinefrin (Kusumawati, 2003) :**

faktor konversi mencit dengan berat badan 20 gram : 0,0026

Dosis epinefrin pada manusia : 0,3–0,5 ml melalui subkutan (Mansjoer dkk, 1999)

Dosis maksimal epinefrin hewan coba

$$= 0,5 \text{ ml} \times 0,0026$$

$$= 0,0013 \text{ ml/ 20 gram BB mencit}$$

$$= 0,001 \text{ ml/20 gram BB mencit} = 0.001 \text{ mg/20 gram BB mencit}$$

Mencit 20-30 gram volume obat maksimal yang diberikan secara subkutan adalah : 0,5-1 ml (Ritchel,1974).

Sediaan obat epinefrin: 1mg/ml diambil 0,5 ml yang kemudian diencerkan dengan NaCl 0.9 % menjadi 100 ml.

Sehingga dosis 1 ml = 0,005 mg

Karena Epinefrin dosis terapeutik maksimal hewan coba sebesar 0,001 mg/20 gram BB mencit sama dengan 0,2 cc.

Lampiran 2

Pembuatan Preparat Histologis Ovarium

a. Fiksasi dan pencucian

Tujuan :

- Mencegah terjadinya degenerasi post mortem
- Mematikan kuman bakteri
- Meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna
- Menjadikan jaringan lebih keras sehingga menjadi lebih mudah dipotong
- Meningkatkan indeks refraksi berbagai komponen jaringan

Reagen : formalin 10 %

Cara kerja :

Setelah diadakan seksi, kedua ovarium mencit diambil, selanjutnya dimasukkan dalam larutan formalin 10 % sekurang- kurangnya 24 jam dan kemudian dilakukan pencucian dengan air kran yang mengalir selama setengah jam

b. Dehidrasi dan Clearing

Tujuan :

Untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Reagen :

Alkohol 70 %, 80 %, 96 %, alkohol absolut I, II, III, Xylol I dan II

Cara kerja :

Ovarium yang telah dicuci dengan air kran selama setengah jam dimasukkan ke dalam reagen dengan urutan : alkohol 70 %, 80 %, 95 %, 96 %, alkohol absolut I, II, II, Xylol I dan II masing-masing setengah jam

c. Infiltrasi (*Embedding*)

Tujuan :

Untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin, dimana parafin akan menembus ruang antar sel dan dalam sel sehingga lebih tahan terhadap pemotongan.

Reagen : Parafin I dan II

Cara kerja :

Jaringan dimasukkan dalam parafin I yang mencair, kemudian dimasukkan ke dalam oven selama setengah jam, selanjutnya dimasukkan ke dalam oven selama setengah jam, selanjutnya dimasukkan kedalam parafin II dan oven setengah jam pada suhu 60°C .

d. Pembuatan balok Parafin

Tujuan : Supaya jaringan mudah dipotong

Reagen : parafin cair

Cara kerja :

Sediakan beberapa cetakan besi yang sebelumnya diolesi gliserin dengan maksud untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan kemudian ovarium dimasukkan dengan pinset kedalamnya, diberi tanda pada masing-masing organ dan ditunggu sampai parafin membeku

e. Pengirisan dengan Mikrotom

Tujuan :

Untuk memotong jaringan setipis mungkin agar mudah dilihat di bawah mikroskop

Alat : mikrotom

Cara kerja :

Organ yang telah di-*blocking*, diletakkan pada *holder*, kemudian dipotong dengan mikrotom setebal 5-7 μ , diambil dan dicelupkan dalam air hangat dengan suhu 20 °C sampai 30 °C agar jaringan mengembang dengan baik, selanjutnya diletakkan pada gelas obyek yang sebelumnya telah diolesi putih telur, kemudian dikeringkan di atas *hot plate*.

f. Pewarnaan**Tujuan :**

Memudahkan melihat perubahan jaringan. Disini digunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Dengan pewarnaan HE dapat dilihat dengan jelas bentuk-bentuk masing-masing selnya, dimana sitoplasma berwarna merah sedangkan intinya berwarna biru.

Cara kerja :

Pewarnaan HE dilakukan dengan metode Harris, dengan cara sebagai berikut : jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam xylol I selama 3 menit dengan tempat khusus dan selama 1 menit pada xylol II, kemudian alkohol absolut I dan II, alkohol 96 %, 80 %, 70 % dan air kran masing-masing 1 menit. Kemudian jaringan atau organ dimasukkan ke dalam zat warna hematoxylin selama 5-10 menit, air kran 2-5 menit, asam alkohol 3-10 celupan, air kran 4-7 celupan, amoniak 6 celupan, air kran 10 menit, aquades secukupnya. Kemudian dimasukkan dalam alkohol 70 %, alkohol 80 % masing-masing setengah menit, alkohol 96 % alkohol absolut I dan II selama 1 menit, yang terakhir dimasukkan ke dalam xylol I dan II masing-masing selama 102 menit dan selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa pewarnaan

g. Mounting

Penutupan gelas obyek dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi

Canada balsem



Lampiran 3

Tabel 1. Konversi perhitungan dosis untuk beberapa jenis hewan dan manusia (Laurence dan Bacharah, 1964 cit Kusumawati, 2003)

| | Mencit 20 g | Tikus 200 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 | 7,0 | 2,25 | 27,8 | 29,7 | 64,1 | 124,2 | 387,9 |
| Tikus 200 g | 0,14 | 1,0 | 1,74 | 3,9 | 4,2 | 9,2 | 17,8 | 56,0 |
| Marmot 400 g | 0,08 | 0,57 | 1,0 | 2,25 | 2,4 | 5,2 | 10,2 | 31,5 |
| Kelinci 1,5 Kg | 0,04 | 0,25 | 0,44 | 1,0 | 1,08 | 2,4 | 4,5 | 14,2 |
| Kucing 2 Kg | 0,03 | 0,23 | 0,41 | 0,92 | 1,0 | 2,2 | 41 | 13,0 |
| Kera 4 Kg | 0,016 | 0,11 | 0,19 | 0,42 | 0,45 | 1,0 | 1,9 | 6,1 |
| Anjing 12 Kg | 0,008 | 0,06 | 0,10 | 0,22 | 0,24 | 0,52 | 1,0 | 3,1 |
| Manusia 70 Kg | 0,0026 | 0,018 | 0,03 | 0,07 | 0,076 | 0,16 | 0,32 | 1,0 |

Lampiran 4

Tabel 2. Volume maksimal yang dapat diberikan pada beberapa hewan spesies hewan (Ritchel, 1974)

| Spesies | Subkutan | intramuskular | intraperitoneal | itravena | Per oral |
|-------------------|----------|---------------|-----------------|----------|----------|
| Mencit 20-30 g | 0.5-1 ml | 0.05 ml | 1 ml | 0.5 ml | 1 ml |
| Tikus 100 g | 2-5 ml | 0.1 ml | 2-5 ml | 1 ml | 5 ml |
| Hamster 50 g | 2.5 ml | 0.1 ml | 1-2 ml | 0.3 ml | 2.5 ml |
| Kelinci 2,5 kg | 5-10 ml | 0.5-1 ml | 10-20 ml | 5-10 ml | 20 ml |
| Kucing 3 kg | 5-10 ml | 1 ml | 10-20 ml | 5-10 ml | 50 ml |
| Anjing 5 Kg | 10 ml | 5 ml | 20-50 ml | 10-20 ml | 100 ml |
| Merpati 300 g | 2 ml | 05 ml | 2 ml | 2 ml | 10 ml |

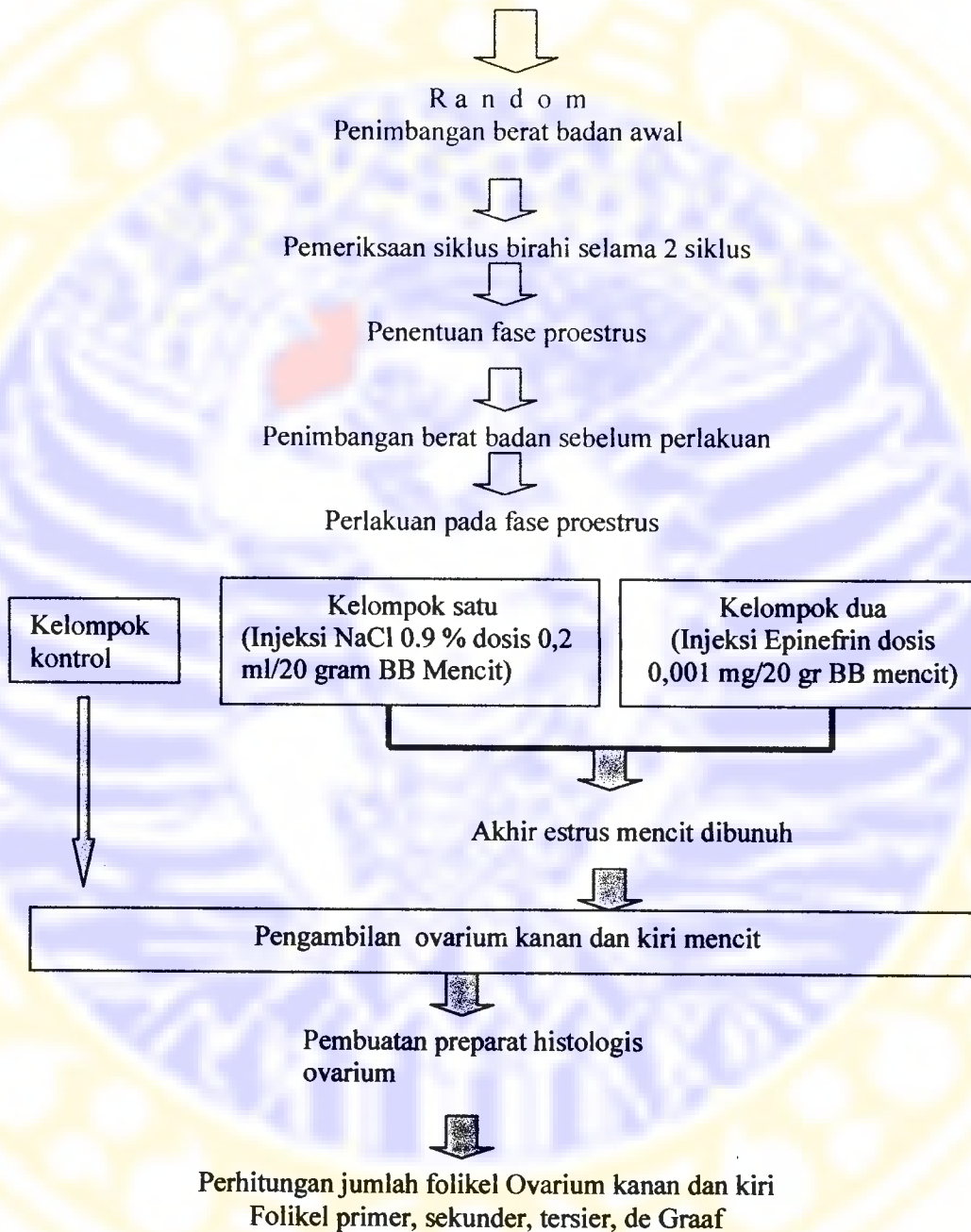
Lampiran 5

JADWAL PENELITIAN

| Kegiatan | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|-------|------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Juni | juli | Agust | Sept | Okt | Nop | Des | Jan | Feb | |
| Persiapan penelitian | X | X | X | X | | | | | | |
| Pelaksanaan penelitian | | | | X | X | | | | | |
| Studi kepustakaan | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| Pengukuran variabel penelitian | | | | | | X | X | | | |
| Penyusunan laporan penelitian | | | | | | X | X | X | | |
| Ujian | | | | | | | | | X | |

Lampiran 6

Mencit dari penangkaran Lab Biokimia FK Unair
Syarat : mencit betina, usia sekitar 2 bulan, sehat,
tidak hamil



Lampiran 7

Pakan Hewan Coba

Pakan hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah BR-II produksi PT. Japfa Comfeed Indonesia. BR-II (Broiler-II) merupakan pakan ayam pedaging untuk usia 22 hari dan seterusnya. Komposisi BR-II adalah sebagai berikut :

- | | |
|------------------|----------------|
| a. Air | maks 12 % |
| b. Protein Kasar | maks 19 % |
| c. Lemak kasar | maks 4 % |
| d. Serat kasar | maks 5 % |
| d. Debu | maks 6,5 % |
| e. Kalsium | maks 0.9-1.1 % |
| f. Fosfor | maks 0.7-0.9 |
| g. coccidiostat | + |
| h. Antibiotika | + |

takaran berat pakan hewan coba yang diberikan setiap harinya kurang lebih sebanyak 50 gr/ekor.

Lampiran 8

| NO | Jumlah Folikel Primer | Jumlah Folikel sekunder | Jumlah Folikel tersier | Jumlah Folikel De Graaft | Kelompok |
|----|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 25 | 11 | 11 | 5 | KP |
| 2 | 21 | 5 | 11 | 8 | |
| 3 | 17 | 10 | 14 | 6 | |
| 4 | 18 | 13 | 3 | 6 | |
| 5 | 28 | 20 | 9 | 5 | |
| 6 | 16 | 9 | 4 | 8 | |
| 7 | 15 | 16 | 10 | 6 | |
| 8 | 18 | 5 | 4 | 4 | |
| 9 | 17 | 9 | 10 | 8 | |
| 10 | 7 | 5 | 2 | 5 | |
| 11 | 13 | 8 | 4 | 3 | K1 NaCl |
| 12 | 15 | 10 | 4 | 5 | |
| 13 | 13 | 8 | 4 | 2 | |
| 14 | 14 | 6 | 2 | 4 | |
| 15 | 12 | 8 | 6 | 3 | |
| 16 | 24 | 14 | 6 | 4 | |
| 17 | 19 | 13 | 3 | 3 | |
| 18 | 16 | 11 | 8 | 6 | |
| 19 | 16 | 11 | 6 | 2 | |
| 20 | 17 | 10 | 6 | 5 | |
| 21 | 16 | 4 | 6 | 2 | K2 Epi |
| 22 | 10 | 7 | 3 | 0 | |
| 23 | 18 | 12 | 3 | 1 | |
| 24 | 15 | 17 | 5 | 1 | |
| 25 | 19 | 6 | 3 | 1 | |
| 26 | 16 | 3 | 2 | 0 | |
| 27 | 8 | 4 | 6 | 2 | |
| 28 | 14 | 5 | 6 | 2 | |
| 29 | 17 | 8 | 6 | 0 | |
| 30 | 16 | 5 | 5 | 1 | |

Keterangan :

- KP : Kelompok kontrol posttest
 K1 NaCl : Kelompok 1 yang diinjeksi NaCl 0,9 %
 K2 epi : Kelompok 2 yang diinjeksi epinefrin

Lampiran 9

UJI NORMALITAS FOLIKEL OVARIUM MENCIT BETINA**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

| | | folikel Primer | Folikel Sekunder | Folikel tersier | Folikel de Graaf |
|--------------------------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|
| N | | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Normal Parameters ^a | Mean | 16.3333 | 9.1000 | 5.7333 | 3.6000 |
| | Std. Deviation | 4.4360 | 4.1800 | 3.0618 | 2.4297 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .154 | .104 | .232 | .145 |
| | Positive | .154 | .104 | .232 | .145 |
| | Negative | -.115 | -.078 | -.111 | -.118 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .841 | .571 | 1.271 | .794 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .479 | .901 | .079 | .555 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

| kelompok | Mean | Std. Deviation | N | |
|------------------|------------------------------|----------------|--------|----|
| folikel Primer | pretes | 18.2000 | 5.7116 | 10 |
| | kontrol (injeksi NaCl 0.9 %) | 15.9000 | 3.5418 | 10 |
| | posttest (injeksi epinefrin) | 14.9000 | 3.4464 | 10 |
| | Total | 16.3333 | 4.4360 | 30 |
| Folikel Sekunder | pretes | 10.3000 | 4.9677 | 10 |
| | kontrol (injeksi NaCl 0.9 %) | 9.9000 | 2.4698 | 10 |
| | posttest (injeksi epinefrin) | 7.1000 | 4.3321 | 10 |
| | Total | 9.1000 | 4.1800 | 30 |
| Folikel tersier | pretes | 7.8000 | 4.1580 | 10 |
| | kontrol (injeksi NaCl 0.9 %) | 4.9000 | 1.7920 | 10 |
| | posttest (injeksi epinefrin) | 4.5000 | 1.5811 | 10 |
| | Total | 5.7333 | 3.0618 | 30 |
| Folikel de Graaf | pretes | 6.1000 | 1.4491 | 10 |
| | kontrol (injeksi NaCl 0.9 %) | 3.7000 | 1.3375 | 10 |
| | posttest (injeksi epinefrin) | 1.0000 | .8165 | 10 |
| | Total | 3.6000 | 2.4297 | 30 |

Lampiran 10

UJI HOMOGENITAS FOLIKEL OVARUM**Levene's Test of Equality of Error Variance**

| | F | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|--------|-----|-----|------|
| folikel Primer | .706 | 2 | 27 | .502 |
| Folikel Sekunder | 1.400 | 2 | 27 | .264 |
| Folikel tersier | 13.342 | 2 | 27 | .000 |
| Folikel de Graaf | 1.987 | 2 | 27 | .157 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+DATA

Lampiran 11

UJI MULTIVARIATE ANOVA (MANOVA) FOLIKEL OVARIUM

General Linear Model

Between-Subjects Factors

| | | Value Label | N |
|----------|------|---------------------------------|----|
| kelompok | 1.00 | kelompok kontrol posttest | 10 |
| | 2.00 | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | 10 |
| | 3.00 | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 10 |

Box's Test of Equality of Covariance Matrices^a

| | |
|---------|--------|
| Box's M | 37.423 |
| F | 1.460 |
| df1 | 20 |
| df2 | 2617 |
| Sig. | .085 |

Tests the null hypothesis that the observed covariance matrices of the dependent variables are equal across groups.

a. Design: Intercept+DATA

Multivariate Tests

| Effect | Value | F | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|--------------------------|--------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept Pillai's Trace | .963 | 155.928 ^a | 4.000 | 24.000 | .000 |
| Wilks' Lambda | .037 | 155.928 ^a | 4.000 | 24.000 | .000 |
| Hotelling's Trace | 25.988 | 155.928 ^a | 4.000 | 24.000 | .000 |
| Roy's Largest Root | 25.988 | 155.928 ^a | 4.000 | 24.000 | .000 |
| DATA Pillai's Trace | .876 | 4.873 | 8.000 | 50.000 | .000 |
| Wilks' Lambda | .202 | 7.357 ^a | 8.000 | 48.000 | .000 |
| Hotelling's Trace | 3.570 | 10.262 | 8.000 | 46.000 | .000 |
| Roy's Largest Root | 3.458 | 21.611 ^b | 4.000 | 25.000 | .000 |

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+DATA

Tests of Between-Subjects Effects

| Source | Dependent Variable | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-----------------|--------------------|-------------------------|----|-------------|---------|------|
| Corrected Model | folikel Primer | 57.267 ^a | 2 | 28.633 | 1.506 | .240 |
| | Folikel Sekunder | 60.800 ^b | 2 | 30.400 | 1.841 | .178 |
| | Folikel tersier | 64.867 ^c | 2 | 32.433 | 4.230 | .025 |
| | Folikel de Graaf | 130.200 ^d | 2 | 65.100 | 42.871 | .000 |
| Intercept | folikel Primer | 8003.333 | 1 | 8003.333 | 420.900 | .000 |
| | Folikel Sekunder | 2484.300 | 1 | 2484.300 | 150.429 | .000 |
| | Folikel tersier | 986.133 | 1 | 986.133 | 128.626 | .000 |
| | Folikel de Graaf | 388.800 | 1 | 388.800 | 256.039 | .000 |
| DATA | folikel Primer | 57.267 | 2 | 28.633 | 1.506 | .240 |
| | Folikel Sekunder | 60.800 | 2 | 30.400 | 1.841 | .178 |
| | Folikel tersier | 64.867 | 2 | 32.433 | 4.230 | .025 |
| | Folikel de Graaf | 130.200 | 2 | 65.100 | 42.871 | .000 |
| Error | folikel Primer | 513.400 | 27 | 19.015 | | |
| | Folikel Sekunder | 445.900 | 27 | 16.515 | | |
| | Folikel tersier | 207.000 | 27 | 7.667 | | |
| | Folikel de Graaf | 41.000 | 27 | 1.519 | | |
| Total | folikel Primer | 8574.000 | 30 | | | |
| | Folikel Sekunder | 2991.000 | 30 | | | |
| | Folikel tersier | 1258.000 | 30 | | | |
| | Folikel de Graaf | 560.000 | 30 | | | |
| Corrected Total | folikel Primer | 570.667 | 29 | | | |
| | Folikel Sekunder | 506.700 | 29 | | | |
| | Folikel tersier | 271.867 | 29 | | | |
| | Folikel de Graaf | 171.200 | 29 | | | |

a. R Squared = .100 (Adjusted R Squared = .034)

b. R Squared = .120 (Adjusted R Squared = .055)

c. R Squared = .239 (Adjusted R Squared = .182)

d. R Squared = .761 (Adjusted R Squared = .743)

Lampiran 12

UJI BEDA NYATA TERKECIL (BNT)

Multiple Comparisons

LSD

| Dependent Variable | (I) kelompok | (J) kelompok | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------|---------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| folikel Primer | kelompok kontrol posttest | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | 2.3000 | 1.9501 | .249 | -1.7013 | 6.3013 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 3.3000 | 1.9501 | .102 | -.7013 | 7.3013 |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | kelompok kontrol posttest | -2.3000 | 1.9501 | .249 | -6.3013 | 1.7013 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 1.0000 | 1.9501 | .612 | -3.0013 | 5.0013 |
| kelompok 2 (injeksi epinefrin) | kelompok kontrol posttest | -3.3000 | 1.9501 | .102 | -7.3013 | .7013 | |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | -1.0000 | 1.9501 | .612 | -5.0013 | 3.0013 | |
| Folikel Sekunder | kelompok kontrol posttest | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | .4000 | 1.8174 | .827 | -3.3290 | 4.1290 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 3.2000 | 1.8174 | .090 | -.5290 | 6.9290 |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | kelompok kontrol posttest | -.4000 | 1.8174 | .827 | -4.1290 | 3.3290 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 2.8000 | 1.8174 | .135 | .9290 | 6.5290 |
| kelompok 2 (injeksi epinefrin) | kelompok kontrol posttest | -3.2000 | 1.8174 | .090 | -6.9290 | .5290 | |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | -2.8000 | 1.8174 | .135 | -6.5290 | .9290 | |
| Folikel tersier | kelompok kontrol posttest | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | 2.9000* | 1.2383 | .027 | .3593 | 5.4407 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 3.3000* | 1.2383 | .013 | .7593 | 5.8407 |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | kelompok kontrol posttest | -2.9000* | 1.2383 | .027 | -5.4407 | -.3593 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | .4000 | 1.2383 | .749 | -2.1407 | 2.9407 |
| kelompok 2 (injeksi epinefrin) | kelompok kontrol posttest | -3.3000* | 1.2383 | .013 | -5.8407 | -.7593 | |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | -.4000 | 1.2383 | .749 | -2.9407 | 2.1407 | |
| Folikel de Graaf | kelompok kontrol posttest | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | 2.4000* | .5511 | .000 | 1.2693 | 3.5307 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 5.1000* | .5511 | .000 | 3.9693 | 6.2307 |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | kelompok kontrol posttest | -2.4000* | .5511 | .000 | -3.5307 | -1.2693 |
| | | kelompok 2 (injeksi epinefrin) | 2.7000* | .5511 | .000 | 1.5693 | 3.8307 |
| kelompok 2 (injeksi epinefrin) | kelompok kontrol posttest | -5.1000* | .5511 | .000 | -6.2307 | -3.9693 | |
| | kelompok 1 (injeksi NaCl 0.9 %) | -2.7000* | .5511 | .000 | -3.8307 | -1.5693 | |

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