

DISERTASI

**MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCIT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK**



ENY SUSANTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCIT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK**



ENY SUSANTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCIT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK**

ENY SUSANTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCIT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada Hari : Kamis
Tanggal : 13 Februari 2020
Pukul : 10.00-12.00 WIB**

**Oleh :
ENY SUSANTI
NIM:011717017310**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

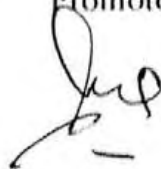
DISERTASI

**MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCTT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK**

**YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 14 FEBRUARI 2020**

Oleh

Promotor



Prof. Dr.H. Hendy Hendarto, dr, Sp. OG(K)
NIP. 19610817 198802 1 002

Kopromotor



Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.Si
NIP.19550705 198003 1 005

Disertasi ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji Ujian Tahap 1 (tertutup)
pada tanggal 7 Januari 2020

Panitia Penguji :

Ketua : Prof. Dr. Widjiati, drh, M.Si
Anggota : 1. Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr, Sp. OG(K)
2. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.Si
3. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes
4. Dr. Ni Wajan Tirtaningsih, dr., MS.PA(K)
5. Dr. Bambang Purwanto, dr, M.Kes
6. Dr. dr. Arsana Wiyasa, SpOG(K)

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi

Nomor : 7/UN3.1.1/KD/2020
Tanggal 7 Januari 2020

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah rabbil 'alamiim, puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan hidayahnya, sehingga saya menyelesaikan penelitian disertasi dengan judul “ Mekanisme gangguan folikulogenesis pada mencit *Mus musculus* terpapar asap rokok”. Tidak lupa sholawat dan salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW.

Disertasi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari peran, bimbingan, arahan, dorongan, saran dan perbaikan dari promotor, ko promotor dan para penguji. Pada kesempatan kali ini dengan segala kerendahan hati saya menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga atas segala bimbingan, arahan, dukungan dan do'a kepada semua pihak dalam menyelesaikan penelitian disertasi ini. Oleh karena itu perkenankan saya untuk mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr,Sp.OG(K) terimakasih atas kesediaan beliau menjadi promotor saya, dengan sabar di tengah-tengah kesibukan beliau di RSUD Dr. Sutomo tetapi bisa meluangkan waktu kepada saya untuk memberikan bimbingan, arahan dan selalu memotivasi saya sehingga bisa menyelesaikan penelitian dan penyusunan disertasi dengan lancar dan tepat waktu. Tidak lupa juga saya sampaikan terimakasih yang tak terhingga telah diberi kesempatan untuk mengikuti seleksi hibah PDD (Penelitian Disertasi Dosen) Dikti dari Universitas Airlangga dan Alhamdulillah lulus hibah. Terimakasih atas ilmu

beliau tentang infertilitas pada kesehatan reproduksi yang berhubungan dengan folikulogenesis.

Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.Si, selaku penasehat akademik dan kopromotor saya. Terimakasih saya sampaikan karena beliau sudah berkenan mendaftarkan saya untuk mengikuti hibah PDD (Penelitian Disertasi Dosen) dan lolos hibah penelitian Dikti dari Universitas Airlangga.

Terima kasih tak terhingga saya sampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi Dikti telah memberikan bantuan beasiswa BPPDN, para pimpinan dan staf bagian pendidikan Universitas Airlangga yang telah memfasilitasi dan membantu pengurusan beasiswa BPPDN.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankan saya juga mengucapkan terima kasih kepada :

Prof. Dr. Muhammad Nasih, SE.,MT.,CMA., CA selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Soetojo,dr., SpU(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR, selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga, yang telah memberikan fasilitas, dukungan srt a motivasi kepada saya untuk menyelesaikan

disertasi dan pendidikan Doktor dengan tepat waktu pada Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Ketua Yayasan Ngudia Husada Madura Dr. Mustofa Haris, S.Kp,M.Kes dan ketua STIKes Ngudia Husada Madura Dr. M. Hasinuddin,S.Kep,Ns,M.Kep yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan jenjang Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Para dosen Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Suhartono Taat Putra,dr., MS, Prof. Soetjipto,dr,MS.,PhD, Prof. Dr. Zainuddin,Apt, Prof. Purnomo Sutyohudoyo,dr.,SpBK, Dr. Florentina Sistini,dr.,MS, Dr. Sunaryo,dr.,MS.,M.SC, Dr. Hj. Susilowati Andajani,dr.,MS, Dr. Hari Basuki Notobroto,dr.,M.SKes, Dr. Budi Utomo,dr.,M.Kes, Dr.PH Widodo J.P,dr.,M.PH, Prof. Joes Priyatna Dachlan,dr.,MSc.,Sp.Par(K), Prof. Dr. I Ketut Suidiana,Drs.,M.Si, serta dosen pengajar MKPD Prof. Dr. Widjiati,drh.,M.Si, Dr. Hari Basuki Notobroto,dr., M.Kes, , Dr. Bambang Purwanto, dr., M.Kes, telah memberikan ilmu pengetahuan dasar dan terapan yang sangat berharga dan bermanfaat mebantunya dalam menyusun disertasi.

Terima kasih para dosen penguji yang sangat saya hormati, atas bimbingan serta sarannya mulai dari ujian kualifikasi sampai dengan ujian tertutup : Prof. Dr. Widjiati,drh.,M.Si, Dr. Hari Basuki Notobroto,dr., M.Kes, Dr. Ni Wayan Tirtaningsih,dr,MS.PA(K), Dr. Bambang Purwanto, dr., M.Kes, dosen Universitas Airlangga, serta penguji luar Dr. dr. Arsana Wiyasa,Sp.OG(K) dosen Universitas Brawijaya.

Terimakasih Komite Etik penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas masukan dan saran yang diberikan untuk pelaksanaan penelitian saya. Prof. Dr. Widjiati,drh.,M.Si, beserta staf dan jajarannya yang telah banyak membantu serta memberikan kesempatan dan mendukung saya untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Terima kasih Prof. Dr. I Ketut Sudiana, M.Si kepala Departemen Mikroskop Elektron Laboratorium Medis Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta staf dan jajarannya yang telah banyak membantu dalam pemeriksaan dan pembacaan hasil penelitian saya.

Dr. Hari Basuki Notobroto,dr., M.Kes yang telah memberikan bimbingan dan saran tentang metodologi penelitian serta hasil analisis data statistik penelitian saya.

Seluruh staf di Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas semua jerih payahnya dalam melancarkan proses administrasi kependidikan.

Para pustakawan di perpustakaan Universitas Airlangga, atas segala bantuan dan pelayanan yang telah diberikan kepada saya selama menempuh masa pendidikan. Seluruah teman senasib seperjuangan angkatan 2017/2018 Program Studi Ilmu Kedokteran, Jenjang Doktor, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang saling memberi motivasi, masukan dan semangatnya dalam menempuh masa pendidikan.

Dosen beserta staf STIKes Ngudia Husada Madura, saya mengucapkan terima kasih yang setinggi tingginya atas segala dorongan moril, doa dan motivasinya sehingga saya dapat menyelesaikan studi ini dengan tepat waktu.

Ketua IBI Cabang Bangkalan, beserta pengurus terima kasih atas doa dan dukungannya, serta ijinnya sehingga saya dapat menyelesaikan studi dengan lancar dan tepat waktu.

Selanjutnya pada kesempatan ini perkenankan saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang dari lubuk hati yang paling dalam yang tidak bisa saya balas dengan apapun kepada :

Orang tua saya, Alm. H. Moh Latif Santoso dan Hj. Kiptiyah yang telah mengasuh, mendidik, membesarkan dan memberikan pendidikan kepada saya sampai saat ini. Juga kepada mertua saya H. Muzammil dan Hj. Mutimmah terima kasih atas kesabaran, doa dan dukungannya kepada saya dan anak-anak saya selama saya menempuh pendidikan ini, sehingga saya berhasil menyelesaikan dengan tepat waktu. Terima kasih juga saya sampaikan kepada saudara-saudara dan ipar saya yang telah memberi dukungan.

Ucapan terima kasih yang sebenar-besarnya dan tak terhingga, serta cinta dan kasih sayangnya selama ini kepada suami tercinta H. Moh. Zainy dan anak-anak saya : Queentha Nadila El Haq, Yumna Anisa Medina El Aqsa, Muhammad Rais Akbar Al Latif atas kesabaran, doa, serta dukungannya, maafkan ummi telah banyak menyita waktu buat kalian semua.

Terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan doa, motivasi,, mendukung dan membantu hingga disertasi ini dapat disusun. Semoga menjadi amal soleh, dicatat dan diterima Allah

SWT dan diberikan balasan pahala yang berlipat ganda di dunia maupun di akhirat nanti. Akhir kata pada kesempatan ini saya mohon maaf atas kesalahan baik yang disengaja maupun tidak dalam penulisan naskah disertasi ini. Besar harapan saya penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemajuan Ilmu Kedokteran khususnya di bidang kesehatan reproduksi, semoga Allah SWT selalu melimpahkan keberkahan dan kekuatan bagi kita semua sehingga dapat mengemban dan berbagi ilmu pengetahuan untuk kepentingan kemanusiaan. Aamiin Yaa Robbal Aalamiin.

Surabaya, Februari 2020

Penulis

RINGKASAN
MEKANISME GANGGUAN FOLIKULOGENESIS
PADA MENCIT *MUS MUSCULUS* TERPAPAR ASAP ROKOK

Infertilitas merupakan masalah yang dialami wanita maupun pria di seluruh dunia. Prevalensi penyebab infertilitas pada wanita menurut WHO diantaranya adalah gangguan ovulasi 33%. Gangguan proses ovulasi biasanya disebabkan karena gangguan hipotalamus-hipofisis, ovarium, dan endometrium sehingga terjadi gangguan proses pematangan folikel serta gangguan implantasi. Salah satu pemicu terjadinya gangguan proses pematangan oosit adanya ROS yang dapat mempengaruhi terjadinya stress oksidatif yang salah satunya disebabkan oleh zat yang terkandung dalam asap rokok. Kenyataan di masyarakat, kebiasaan merokok masih sulit dihentikan, walaupun petugas kesehatan dan media sudah sering mensosialisasikan tentang bahaya asap rokok. Tujuan Penelitian : untuk menjelaskan mekanisme gangguan folikulogenesis pada mencit *Mus musculus* terpapar asap rokok.

Penelitian ini menggunakan rancangan *True Experimental* dengan *post test control group design*. Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 mencit *Mus musculus* Balbb/c betina yang berumur sekitar 8-10 minggu dengan berat badan 25-30 gram. Variable independent adalah paparan asap rokok, sedangkan variabel antara adalah kadar MDA, kadar GnRH, ekspresi HSP70, ekspresi Smad 3, ekspresi GDF 9, indeks apoptosis sel teka, indeks apoptosis sel oosit serta variabel dependent adalah jumlah folikel, penelitian ini dibagi 2 kelompok : Kelompok 1 : Kelompok kontrol tanpa pemberian asap rokok, Kelompok 2 : kelompok perlakuan dengan pemberian asap rokok dosis 1 batang per hari selama 20 hari. Analisis data menggunakan uji *independent t test* atau *Mann Withney*.

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa asap rokok meningkatkan kadar MDA (p: 0.000), asap rokok signifikan menurunkan kadar GnRH (p: 0.000), asap rokok signifikan menurunkan ekspresi HSP 70 di sel teka (p: 0.002), asap rokok signifikan menurunkan ekspresi Smad 3 (p: 0.000), asap rokok signifikan menurunkan ekspresi GDF 9 (p: 0.000), asap rokok signifikan meningkatkan indeks apoptosis sel teka (p: 0.000), asap rokok tidak mempengaruhi kadar indeks apoptosis sel oosit (p: 1). Asap rokok menurunkan jumlah folikel di ovarium (0.004). Pada analisis jalur didapatkan hasil bahwa asap rokok meningkatkan kadar MDA ($\beta=0.676$, $p=0.001$), kadar MDA tinggi menurunkan ekspresi HSP70 ($\beta=-0.462$, $p=0.040$), kadar HSP rendah meningkatkan indeks apoptosis pada sel teka ($\beta=-0.662$, $p=0.001$), indeks apoptosis pada sel teka tinggi menurunkan jumlah folikel ($\beta=-0.593$,

$p=0.006$). Pada jalur lain Peningkatan kadar MDA juga menurunkan kadar GnRH pada serum darah mencit ($\beta=-0.492$, $p=0.028$), selain kadar MDA yang tinggi dapat menurunkan kadar GnRH, namun kadar MDA yang tinggi juga menurunkan ekspresi Smad 3 di sel granulosa ($\beta=-0.337$, $p=0.022$). Kadar GnRH yang rendah mengakibatkan ekspresi Smad 3 di sel granulosa juga rendah ($\beta=0.660$ $p=0.000$). Rendahnya ekspresi Smad 3 di sel granulosa mengakibatkan rendahnya ekspresi GDF9 oleh oosit ($\beta=0.916$ $p=0.000$).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah mekanisme gangguan folikulogenesis akibat paparan asap rokok melalui jalur sel teka, yaitu asap rokok meningkatkan kadar MDA, menurunkan kadar GnRH dan ekspresi HSP 70, serta meningkatkan apoptosis di sel teka sehingga meningkatkan gangguan folikulogenesis. Selain itu, asap rokok berdampak pada sel granulosa melalui penurunan ekspresi smad 3 dan GDF 9 sehingga menurunkan jumlah folikel di ovarium. Keterbatasan pada penelitian ini adalah Penelitian experimental ini tidak bisa dilakukan pada manusia, karena kendala etik perlakuan pada manusia.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu apakah efek paparan asap rokok bersifat reversible dan bagaimana cara mencegah efek paparan asap rokok terhadap folikulogenesis melalui jalur sel teka. Penelitian ini belum bisa mengungkap mekanisme gangguan folikulogenesis melalui jalur apoptosis oosit, , sehingga peneliti merekomendasikan untuk penelitian lanjutan.

SUMMARY

THE MECHANISM OF FOLLICULOGENESIS DISORDER ON *MUS MUSCULUS* MICE EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE

Infertility is a problem experienced by women and men around the world. The prevalence cause of female infertility, according to WHO, is ovulation disorder amount to 33%. The disorder in the ovulation process are usually caused by hypothalamic-pituitary, ovarian, and endometrial disorders. Therefore, it causes disruption of the follicular maturation process and impaired implantation. One of the triggers of oocyte maturation process disruption is the presence of ROS, which can affect the occurrence of oxidative stress, one of which is caused by the substances contained in cigarette smoke. Based on the reality of society, the reality in the community, smoking habits are still difficult to stop, even though health workers and media have often disseminated about the dangers of cigarette smoke. Research Objectives: to explain the mechanism of folliculogenesis disorders in *Mus musculus* mice exposed to cigarette smoke.

This study used a true experimental design with a post-test control group. The study subjects were 20 female Balbb/c *Mus musculus* mice aging around 8-10 weeks and weighing approximately 25-30 grams. The independent variable is cigarette smoke exposure, while the intermediate variables include MDA level, GnRH level, HSP70 expression, Smad3 expression, GDF9 expression, theca cell apoptosis index, oocyte cell apoptosis index. The dependent variable is the number of follicles. This study was divided into two groups: group 1, the control group without cigarette smoke exposure, Group 2, the treatment group exposed to cigarette smoke at a dose of 1 stick of cigarette per day for 20 days. The data analysis used the independent t-test or Mann Whitney test.

The research results suggest that cigarette smoke increased the MDA level (p: 0.000), significantly decreased GnRH level (p: 0.000), significantly decreased HSP 70 expression in theca cells (p: 0.002), significantly decreased Smad expression 3 (p: 0.000), significantly decreased GDF9 expression (p: 0.000), and significantly increased theca cell apoptosis index (p: 0.000). Cigarette smoke did not affect the level of oocyte cell apoptotic index (p: 1) and decreased the number of follicles in the ovary (0.004). On the path analysis, the results show that cigarette smoke increased the MDA level ($\beta = 0.676$, $p = 0.001$). The high MDA level decreased HSP70 expression ($\beta = -0.462$, $p = 0.040$), and low HSP level increased apoptotic index in theca cells ($\beta = -0.662$, $p = 0.001$). The apoptotic index in high theca

cells decreased the number of follicles ($\beta = -0.593$, $p = 0.006$). On another path analysis, the MDA level increase also decreased the GnRH level in blood serum of mice ($\beta = -0.492$, $p = 0.028$) High MDA level can reduce GnRH levels, but it can also reduce Smad3 expression in granulosa cells ($\beta = -0.337$, $p = 0.022$). Low GnRH level results in low Smad3 expression in granulosa cells ($\beta = 0.660$, $p = 0.000$). Low Smad3 expression in granulosa cells results in low expression of GDF9 by oocytes ($\beta=0,916$ $p=0.000$).

The summary from the research results indicates the mechanism of folliculogenesis disorder due to cigarette smoke exposure through theca cell pathway. Cigarette smoke increases the MDA level, decreases the GnRH level and HSP 70 expression, and increases apoptosis in theca cells, thereby increase folliculogenesis disorders. Besides, cigarette smoke affects granulosa cells through the decrease of Smad3 and GDF9 expression through the necrosis pathway in oocytes, thereby reducing the number of follicles in the ovary. The limitation of this research is that the experimental research is not possible on humans, because of ethical constraints on the treatment of human beings which made it impossible to remove ovarian organs.

Further research needs to carry out research which discusses whether the effects of cigarette smoke exposure are reversible and the ways to prevent the effects of cigarette smoke exposure on folliculogenesis through the theca cell pathway. This research has not been capable of revealing the mechanism of folliculogenesis disorder through the oocyte apoptosis pathway, but through another pathway, namely the oocyte necrosis which is supported by high MDA level data in groups exposed to cigarette smoke exposure. Therefore, further research is recommended.