

**PENGARUH EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa*)
TERHADAP KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE
OTAK DAN KADAR FOLLICLE STIMULATING
HORMONE SERUM TIKUS PUTIH BETINA
(*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR
ALUMINIUM**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
ANISSA ERMASARI
196070400111021**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**



TESIS

**PENGARUH EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa*)
TERHADAP KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE
OTAK DAN KADAR *FOLLICLE STIMULATING
HORMONE* SERUM TIKUS PUTIH BETINA
(*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR
ALUMINIUM**

Oleh:

ANISSA ERMASARI
196070400111021

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 13 Agustus 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING



Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
NIP 197511252005012001
Ketua



Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG(K)
NIP 195706301984121001
Anggota

Malang, 19 Agustus 2021
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,



Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K)
NIP. 197307262005011008

TESIS

**PENGARUH EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa*)
TERHADAP KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE
OTAK DAN KADAR *FOLLICLE STIMULATING
HORMONE* SERUM TIKUS PUTIH BETINA
(*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR
ALUMINIUM**

Oleh:
ANISSA ERMASARI
196070400111021

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 13 Agustus 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI



Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
NIP 197511252005012001
Ketua



Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp.OG(K)
NIP 195706301984121001
Anggota Penguji



dr. Yahya Irwanto, Sp.OG (K)
NIP 196805041998031012
Anggota Penguji



Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, M.S
NIPK 20180952100821001
Anggota Penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 13 Agustus 2021



Nama : Anissa Ermasari
NIM : 196070400111021
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



Karya Ilmiah ini Ditujukan Kepada :

Kedua Orangtuaku tercinta, Drs. Giatno, M.Si dan Dra. Nurjannah M.Pd
Kakakku tersayang, Nita Evrianasari, S.ST.,M.Kes dan Wahid Tri Wahyudi S.Kep.,Ns.,M.Kes
Untuk Doa, dukungan dan pengorbanannya agar terselesaikannya tesis ini dengan baik

Untuk diriku, terimakasih sudah berusaha, bertahan dan berjuang sejauh ini
Semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat untuk banyak orang

RINGKASAN

Anissa Ermasari

Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Kadar Superoksida Dismutase Otak dan Kadar *Follicle Stimulating Hormone* Serum Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Aluminium, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Ketua Komisi Pembimbing Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes; Anggota Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K)

Paparan logam berat yang termasuk didalamnya aluminium merupakan salah satu faktor risiko terjadinya infertilitas melalui jalur stres oksidatif di otak. Aluminium akan mengganggu homeostasis besi (Fe) intraseluler dan terlibat dalam reaksi fenton yang akan meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) serta menurunkan enzim antioksidan endogen, salah satunya adalah *superoksida Dismutase* (SOD). Stres oksidatif yang meningkat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga terjadi gangguan pada *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) pada hipotalamus, hal ini menyebabkan kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) & *Luteinizing Hormone* (LH). Kekurangan hormon FSH dapat menghambat proses folikulogenesis yang mengakibatkan infertilitas. Kurkumin adalah antioksidan yang terkandung dalam kunyit (*Curcuma longa*) dapat menghambat pembentukan ROS dan merangsang pembentukan enzim antioksidan endogen. Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kunyit pada kadar SOD otak dan kadar FSH serum tikus putih betina yang dipapar aluminium.

Desain penelitian ini adalah *post test only control group design*, menggunakan sampel 25 ekor tikus yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (paparan aluminium 100 mg/KgBB), Kelompok perlakuan 1/P1 (ekstrak kunyit 100 mg/KgBB dan aluminium 100 mg/kgBB), Kelompok perlakuan 2/P2 (ekstrak kunyit 200 mg/KgBB dan aluminium 100 mg/kgBB), dan Kelompok perlakuan 3/P3 (ekstrak kunyit 400 mg/KgBB dan aluminium 100 mg/kgBB). Semua perlakuan diberikan peroral selama 30 hari dari hari ke-1 sampai hari ke-30. Pembedahan dilakukan pada saat fase estrus. Pemeriksaan kadar SOD otak dan FSH serum dengan menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 450nm. Analisis data menggunakan uji *one way annova* pada SPSS 26.

Uji *one way annova* pada kadar SOD otak didapatkan $p\text{-value}=0,0023$ ($\alpha=0.05$) sehingga terdapat perbedaan yang bermakna pada lima kelompok. Paparan aluminium dapat menurunkan kadar SOD secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Akan tetapi, rerata kadar SOD pada P1, P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kontrol positif. Uji *one way annova* pada kadar FSH serum didapatkan $p\text{-value}=0,0018$ ($\alpha=0.05$). Paparan aluminium dapat menurunkan kadar FSH dan pemberian ekstrak kunyit dapat meningkatkan kadar FSH secara signifikan pada dosis 100 mg/KgBB.

Paparan aluminium dapat menyebabkan Stres oksidatif di otak dan merupakan *Endocrine Disrupting chemical* (EDC) yang dapat mengganggu sintesis hormon dan fungsi fisiologis reproduksi. Kurkumin dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif, menurunkan produksi ROS dan menetralkan radikal bebas serta secara tidak langsung dapat menginduksi ekspresi protein antioksidan seperti SOD, CAT dan GPx. Namun, Kurkumin memiliki efek paradoks, yang dapat bertindak sebagai antioksidan dan prooksidan tergantung pada konsentrasi dan lingkungan seluler. Penurunan SOD pada P3 diduga karena efek paradoks tersebut. Kurkumin juga memiliki efek stimulasi pada

sistem reproduksi dengan memodulasi folikulogenesis, kunyit juga memiliki efek fitoestrogen yang dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah, diduga penurunan kadar FSH pada P3 disebabkan oleh efek umpan balik negatif oleh estrogen pada sekresi FSH.

Kesimpulan dalam penelitian ini pemberian ekstrak kunyit tidak terbukti mencegah penurunan kadar SOD otak, tetapi ekstrak kunyit pada dosis 100 mg/KgBB dapat mencegah penurunan kadar FSH serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium.



SUMMARY

Anissa Ermasari

Effect of Turmeric Extract (*Curcuma longa*) on Brain Superoxide Dismutase Levels and Follicle Stimulating Hormone Serum Levels of Female White Rats (*Rattus norvegicus*)

Exposed to Aluminum, Master Program in Midwifery, Faculty of medicine, Universitas Brawijaya.

Chair of Supervisory commission Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes; Member: Dr. dr. I Wayan Arsana Wijaya, SpOG(K)

Exposure to heavy metals including aluminum is one of the risk factors for infertility through oxidative stress pathways in the brain. Aluminum disrupts intracellular iron (Fe) homeostasis and participates in the Fenton reaction which results in an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) and decrease in endogenous antioxidant enzymes, including Superoxide Dismutase (SOD). Increased oxidative stress promotes lipid peroxidation in the hypothalamus, which impairs the synthesis and secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), causing the pituitary to fail to produce and secrete Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone LH. Infertility is caused by a lack of FSH hormone, which inhibits the process of folliculogenesis. Curcumin, an antioxidant found in turmeric (*Curcuma longa*), can decrease the development of reactive oxygen species (ROS) while also stimulating the production of endogenous antioxidant enzymes. The aim of this study is to determine the effect of turmeric extract on brain SOD and FSH serum levels of female white rats exposed to aluminum.

The study employed a post-test only control group design, with a sample of 25 rats divided into five treatment groups, including the negative control group (normal saline 1ml), Treatment groups 1/P1 (turmeric extract 100 mg/kgBW and aluminum 100 mg/kgBW), treatment 2/P2 (turmeric extract 200 mg/kgBW and aluminum 100 mg/kgBW), and treatment 3/P3 (turmeric extract 400 mg/kgBW and aluminum 100 mg/kgBW) were used. All treatments were given orally for 30 days. During the estrus phase, surgery is conducted. SOD and FSH serum levels in the brain were measured using the ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) technique at 450nm. On SPSS 26, the one-way ANOVA test was used to analyze the data.

The p-value for a one-way ANOVA test on brain SOD levels was 0.0023 ($\alpha=0.05$), indicating that there were significant differences between the five groups. When compared to the negative control group, aluminum exposure can significantly lower SOD levels. However, when compared to the positive control, the mean SOD levels at P1, P2, and P3 were not substantially different. One-way ANOVA test on serum FSH levels obtained p-value = 0.0018 < α ($\alpha=0.05$). Aluminum exposure can reduce FSH levels and turmeric extract can significantly increase FSH levels at a dose of 100 mg/kgBW.

Aluminum exposure can cause oxidative stress in the brain and it's an Endocrine Disrupting Chemical (EDC) that can interfere with hormone synthesis and reproductive physiological functions. Curcumin can protect cells from oxidative damage, reduce ROS production and neutralize free radicals and can indirectly induce the expression of antioxidant proteins such as SOD, CAT and GPx. However, curcumin has a paradoxical effect, which can act as both an antioxidant and a pro-oxidant depending on the concentration and cellular environment. Decreased level of brain SOD at P3 is thought to be due to this paradoxical effect. Curcumin also has a stimulatory effect on the reproductive system by modulating folliculogenesis, turmeric also has a phytoestrogen effect that can increase estrogen levels in the blood, it's suspected that the decrease in FSH levels at P3 is caused by a negative feedback effect by estrogen on FSH secretion.

The conclusion in this study was that the administration of turmeric extract could not prevent a decrease in SOD levels, but turmeric extract at a dose of 100 mg/KgBB could prevent a decrease in serum FSH levels of female white rats (*Rattus norvegicus*) wistar strain exposed to aluminum.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Kadar Superoksida Dismutase Otak dan Kadar *Follicle Stimulating Hormone* Serum Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Aluminium.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS selaku rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajaran atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menenpuh pendidikan Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med, SpA (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas ijin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sutrisno, SpOG (K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di program studi magister kebidanan fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG (K) selaku anggota pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
5. dr.Yahya Irwanto, Sp.OG(K) selaku penguji I dan Dr. dr Endang Sri Wahyuni, MS selaku penguji II yang memberikan masukan dan arahan demi perbaikan tesis ini.

6. Orang tua yang telah memberikan doa, motivasi, kasih sayang, dukungan baik moril maupun materil selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister kebidanan fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.

7. Teman-teman satu angkatan tahun 2019 atas semangat, dukungan dan kebersamaan yang dilalui selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister kebidanan Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

8. Pihak-pihak terkait baik secara langsung maupun tidak langsung yang terlibat dalam penyelesaian tesis ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari sempurna, baik isi maupun penyajian. Oleh karena itu saran dan kritik yang membangun akan penulis terima dengan senang hati untuk memperbaiki tulisan ini supaya lebih baik dan bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2021

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN.....	v
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	6
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan Umum.....	7
1.3.2 Tujuan khusus.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Akademik.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Infertilitas.....	9
2.1.1 Definisi Infertilitas.....	9
2.1.2 Penyebab Infertilitas.....	9
2.2 Aluminium.....	11
2.2.1 Definisi Aluminium.....	11
2.2.2 Aluminium Klorida.....	12
2.2.3 Paparan Aluminium Pada manusia.....	13
2.2.4 Toksikokinetik Aluminium.....	17
2.2.5 Mekanisme Toksisitas Aluminium.....	22
2.2.6 Paparan Aluminium Pada Otak Menginduksi Stres Oksidatif.....	24
2.2.7 Paparan Aluminium pada Reproduksi Wanita.....	26
2.2.8 Pencegahan Toksisitas Aluminium.....	28
2.3 Radikal Bebas, ROS dan Stres Oksidatif.....	30
2.3.1 Radikal Bebas.....	30



2.3.2	Reactive Oxygen Species (ROS)	32
2.3.3	Stres Oksidatif	34
2.4	Antioksidan	37
2.5	Superoksida Dismutase (SOD)	38
2.5.1	Definisi SOD	38
2.5.2	Jenis SOD	38
2.5.3	Peran SOD terhadap Radikal Bebas	40
2.5.4	SOD dan Stres oksidatif di otak yang diinduksi aluminium	41
2.6	FSH (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>)	43
2.6.1	Definisi FSH	43
2.6.2	Struktur Biologi FSH	44
2.6.3	Mekanisme Kerja FSH	45
2.6.4	Peran FSH dalam Reproduksi	47
2.7	Hypothalamic-Pituitary-Ovary (HPO) axis	48
2.8	Kunyit (<i>Curcuma longa</i>)	52
2.8.1	Definisi Kunyit	52
2.8.2	Taksonomi dan Morfologi Kunyit	52
2.8.3	Kandungan Senyawa Kimia di dalam Kunyit	53
2.8.4	Farmakokinetik dan Farmakodinamik Kurkumin	55
2.8.5	Peran Kunyit sebagai antioksidan	55
2.9	Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	57
2.9.1	Taksonomi <i>Rattus norvegicus</i>	57
2.9.2	Fisiologi Umum	57
2.9.3	Kemiripan antara usia tikus dan usia manusia	58
2.9.4	Usia Reproduksi Pada Tikus	59
2.9.5	Siklus reproduksi Tikus	59
2.9.6	Bagian Otak Tikus	61
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN		64
3.1	Kerangka Teori Penelitian	64
3.1.1	Keterangan kerangka Teori	65
3.2	Kerangka Konsep penelitian	67
3.2.1	Keterangan kerangka konsep	68
3.3	Hipotesis Penelitian	69
3.3.1	Sub Hipotesis Penelitian	69
BAB 4 METODE PENELITIAN		70
4.1	Jenis dan Desain Penelitian	70
4.2	Populasi dan sampel penelitian	70
4.2.1	Populasi	70
4.2.2	Besar Sampel	71
4.2.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi	71
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	72
4.3.1	Tempat Penelitian	72
4.3.2	Waktu Penelitian	73
4.4	Variabel Penelitian	73
4.5	Definisi Operasional	74
4.6	Prosedur Penelitian	75
4.6.1	Persiapan Hewan Coba	75
4.6.2	Aklimatisasi tikus	75
4.6.3	Perawatan dan pemeliharaan tikus	76
4.6.4	Pemberian Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>)	77
4.6.5	Pemaparan Aluminium pada tikus betina (<i>Rattus norvegicus</i>)	81

4.6.6	Penentuan Fase Estrus.....	81
4.6.7	Pengambilan Darah dan organ Tikus.....	82
4.6.8	Pengukuran Kadar SOD otak dengan Metode ELISA.....	83
4.6.9	Pengukuran Kadar FSH dengan menggunakan metode ELISA.....	86
4.7	Analisis Data.....	89
4.8	Alur penelitian.....	91
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....		92
5.1	Hasil Pengamatan Laboratorium.....	92
5.2	Hasil pengukuran Efek Pemberian Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>) Pada kadar SOD Otak Tikus putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar Aluminium.....	93
5.2.1	Hasil Uji Prasyarat parametrik kadar SOD otak.....	93
5.2.2	Hasil Uji Perbandingan Kadar SOD Otak.....	94
5.3	Hasil pengukuran Efek Pemberian Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>) Pada kadar FSH Serum Tikus Putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Dipapar Aluminium.....	96
5.3.1	Hasil Uji Prasyarat parametrik kadar FSH Serum.....	96
5.3.2	Hasil Uji Perbandingan Kadar FSH Serum.....	97
5.4	Data Hasil Pengamatan Jumlah Folikel De Graaf dengan Pewarnaan <i>Hematoxylin</i> dan <i>Eosin</i> (HE) Pada Tikus Putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diberikan Ekstrak Kunyit dan Dipapar Aluminium.....	99
5.5	Hasil <i>Molecular Docking</i> Kandungan Kunyit.....	102
BAB 6 PEMBAHASAN.....		104
6.1	Pengaruh Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>) terhadap Kadar SOD Otak Tikus putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar Aluminium.....	104
6.2	Pengaruh Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>) terhadap Kadar FSH Serum Tikus putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar Aluminium.....	107
6.3	Pengaruh Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>) terhadap Rerata Jumlah Folikel <i>De Graaf</i> Tikus putih Betina (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar Aluminium.....	110
6.4	<i>Molecular Docking</i> Kandungan Kunyit.....	112
6.5	Keterbatasan Penelitian.....	113
6.6	Implementasi dalam Asuhan Kebidanan.....	113
BAB 7 PENUTUP.....		115
7.1	Kesimpulan.....	115
7.2	Saran.....	115
DAFTAR PUSTAKA.....		116
LAMPIRAN.....		130
RIWAYAT HIDUP.....		145



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Rentang konsentrasi aluminium dalam makanan..... 15

Tabel 2.2 Beberapa sifat ROS yang menyebabkan kerusakan Sel..... 33

Tabel 2.3 Data Fisiologi umum dan reproduksi rattus norvegicus..... 58

Tabel 4.1 Definisi Operasional 74

Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar SOD otak Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium..... 94

Tabel 5.2 Hasil Uji *One Way Anova* Kadar SOD Otak Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium..... 95

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar FSH Serum Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium..... 97

Tabel 5.4 Hasil Uji *One Way Anova* Kadar FSH Serum Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium..... 98

Tabel 5.5 Rerata Jumlah Folikel *De Graaf* Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium..... 100

Tabel 5.6 Skor *Docking* Kunyit (*Curcuma longa*)..... 102



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Aluminium Klorida (AlCl₃) 13

Gambar 2.2 Transferin Pathway 20

Gambar 2.3 Rute utama aluminium masuk kedalam membrane sel 21

Gambar 2.4 Toksisitas aluminium mengganggu homeostasis Fe 24

Gambar 2.5 Peran ROS dalam kerusakan sel 34

Gambar 2.6 Pembentukan ROS dan Pertahanan SOD 41

Gambar 2.7 Hubungan antara aluminium, ROS, enzim antioksidan 42

Gambar 2.8 Struktur Biologi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) 45

Gambar 2.9 Cross-talk antara sinyal steroidogenik bergantung pada FSH 46

Gambar 2.10 Ilustrasi Hipotalamus dan Hipofisis 50

Gambar 2.11 Hypothalamic-Pituitary-Ovary (HPO) axis 51

Gambar 2.12 Rimpang Kunyit 53

Gambar 2.13 Struktur Kimia beberapa Senyawa dari *Curcuma longa* 54

Gambar 2.14 Gambar Bagian Otak Tikus 63

Gambar 3.1 Kerangka Teori 64

Gambar 3.2 Kerangka Konsep 67

Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian 91

Gambar 5.1 Hasil Swab Vagina Fase Estrus pada Kelompok Sampel 93

Gambar 5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak kunyit dan Paparan aluminium terhadap kadar SOD 96

Gambar 5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak kunyit dan Paparan aluminium terhadap kadar FSH 99

Gambar 5.4 Rerata Jumlah Folikel *De Graaf* Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium 101

Gambar 5.5 Jumlah Folikel *De Graaf* Pada Setiap Kelompok dengan Pewarnaan HE 101



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 *Ethical Clearances* Biosains Universitas Brawijaya..... 130

Lampiran 2 Surat Keterangan bebas Plagiasi..... 131

Lampiran 3 Bukti *Accepted* Jurnal 1..... 132

Lampiran 4 Bukti *Accepted* Jurnal 2..... 133

Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian..... 134

Lampiran 6 Data Berat Badan Tikus..... 140

Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik Kadar SOD..... 141

Lampiran 8 Hasil Analisis Statistik Kadar FSH..... 143



DAFTAR SINGKATAN

- ACHE : *Acetylcholine Esterase*
- ADH : *Antidiuretic Hormone*
- Al : *Aluminium*
- AlCl₃ : *Aluminium klorida*
- APP : *Amyloid precursor protein*
- BBB : *Blood Brain Barrier*
- Ca : *Kalsium*
- CAT : *Catalase*
- CREB : *cAMP regulator elemen binding protein*
- EDCs : *Endocrine Disrupting Chemicals*
- ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- EPA : *The Environmental Protection Agency*
- FAO : *The Food and Agriculture Organization*
- FSH : *Folicle Stimulating Hormone*
- FSHR : *Folicle Stimulating Hormone Receptor*
- GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*
- GPx : *Glutathione peroxide*
- GST : *Glutathione-S-transferase*
- GTP : *Guanosin Trifosfat*
- H₂O₂ : *Hydrogen superoksida*
- HOCl : *Hypochlorous acid*
- HPO : *Hipotalamus-pituitary-ovarium*
- HOBr : *Hypobromous acid*
- icCu/Zn-SOD : *Intraceluler Copper/zinc-SOD*
- ecCu/Zn-SOD : *Extracellular Copper/zinc-SOD*
- IP3 : *Inositol Trisphosphate*

IRE : *Iron Regulatory Element*

IRP : *Iron Regulator Protein*

LH : *Luteinizing Hormone*

LPO : *Lipid Peroxidation*

LSD : *Least significant Difference*

MDA : *Malondialdehida*

Mg : *Magnesium*

Mn-SOD : *Manganese-SOD*

NO : *Nitric Oxide*

NO₃⁻ : *Peroxynitrite*

¹O₂ : *Singlet Oxygen*

O₂⁻ : *Superoxide*

O₃ : *Ozone*

OH[•] : *Hydroxyl radical*

PCOS : *Polycystic Ovary Syndrome*

PI3K : *Phosphoinositide-3 kinase*

POF : *Premature Ovarian Failure*

RO[•] : *Alkoxy radical*

ROO[•] : *Peroxy Radicals*

ROOH : *Organic peroxide*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RNS : *Reactive nitrogen species*

SOD : *Superoxide Dismutase*

TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*

WHO : *World Health Organization*



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara global infertilitas mempengaruhi 15% pasangan usia reproduksi (Sun *et al.*, 2019), di seluruh dunia lebih dari 186 juta orang mengalami infertilitas, dan sebagian besar terjadi pada penduduk negara berkembang (Vander Borgh & Wyns, 2018). Di antara berbagai wilayah di dunia, Asia Tenggara memiliki prevalensi infertilitas yang tinggi (Elhussein *et al.*, 2019). Di Indonesia Infertilitas terjadi pada 10-15% pasangan usia subur (Harzif *et al.*, 2019).

Infertilitas didefinisikan sebagai penyakit pada sistem reproduksi yang ditandai dengan ketidak mampuan untuk hamil dalam waktu 12 bulan atau lebih setelah aktif berhubungan seksual teratur tanpa perlindungan (Elhussein *et al.*, 2019). Terdapat banyak faktor yang dapat menyebabkan infertilitas, 8-12% disebabkan oleh berbagai gaya hidup seperti usia, nutrisi, olahraga, obesitas, stres psikologis, merokok, dan penggunaan alkohol (Lee *et al.*, 2020), selain itu faktor resiko penting infertilitas adalah paparan polutan lingkungan seperti bahan kimia, polusi udara dan logam berat (Sengupta *et al.*, 2015).

Aluminium (Al) adalah unsur paling banyak ketiga di kerak bumi setelah oksigen dan silikon (Tietz *et al.*, 2019). Aluminium merupakan logam berat yang keberadaannya berlimpah dan banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari (Drazba, 2019). Distribusi yang luas dari aluminium, memiliki potensi untuk menyebabkan paparan dan bahaya pada manusia (Sharma *et al.*, 2015).

Aluminium cenderung terakumulasi di dalam tubuh, akumulasinya dalam jaringan dan organ mengakibatkan disfungsi dan toksisitas. Telah terbukti bahwa Al beracun bagi berbagai organ dan sistem tubuh, seperti otak, hati, darah, dan sistem reproduksi (Drazba, 2019).

Sumber paparan aluminium pada manusia sangat beragam, karena aluminium tersebar luas di alam, udara, air dan tumbuhan (Rezaee *et al.*, 2010).

Paparan aluminium pada manusia dapat berasal dari makanan, air minum, obat-obatan dan juga lingkungan (Ajibade *et al.*, 2019). Aluminium digunakan untuk pengemasan atau pemrosesan penyimpanan makanan (Tietz *et al.*, 2019) dan juga terdapat di peralatan masak (Niu, 2018). Terjadi kontaminasi aluminium pada makanan jika dibuat dengan cara dipanggang dalam aluminium foil (Dordevic *et al.*, 2019). Dalam bidang medis aluminium digunakan sebagai adjuvant dalam vaksin (Klotz *et al.*, 2017). Paparan dan asupan yang terjadi terus menerus akan menyebabkan aluminium terakumulasi didalam tubuh dan menyebabkan toksisitas (Igbokwe *et al.*, 2019).

Inhalasi atau penghirupan, menelan (melalui makanan dan air minum) dan kontak dermal adalah jalur utama yang dilalui aluminium masuk ke dalam tubuh (Igbokwe *et al.*, 2019). Rata-rata penyerapan oral dari makanan adalah 0,1%, sedangkan dari air minum sedikit lebih tinggi yaitu 0,3% (Tietz *et al.*, 2019).

The Food and Agriculture Organization (FAO) pada awalnya merekomendasikan asupan aluminium yang dapat ditoleransi perminggu sebesar 7 mg/kg BB namun kemudian diturunkan menjadi 1 mg/kg karena berefek pada fungsi reproduksi dan perkembangan suster syaraf (Dolara, 2014). Menurut WHO ambang batas yang diizinkan untuk aluminium dalam air minum adalah 0,1-0,2 mg/L (WHO, 2017). Sedangkan di Indonesia hal tersebut diatur dalam permenkes RI No 70 tahun 2016 yakni batas aman kandungan aluminium di air minum adalah 0,2 mg/l (Kemenkes RI, 2016).

Toksikitas akibat akumulasi aluminium dalam jaringan mamalia dikaitkan dengan berbagai efek patologis (Igbokwe *et al.*, 2019). *American Association Of Poison Control Centers National Poison Data system* pada tahun 2015 melaporkan terdapat 699 kasus paparan tunggal aluminium yang menyebabkan

keracunan aluminium tingkat sedang sejumlah 12 orang, tingkat berat sebanyak 3 orang dan kematian sebanyak 2 orang (Mowry *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa paparan aluminium dapat menurunkan fertilitas baik pada jantan maupun betina (Miska-Schramm *et al.*, 2017). Aluminium dapat berperan sebagai *endocrine disruptor* apabila digunakan secara terus menerus (Gorgogietas *et al.*, 2018). *Endocrine Disrupting chemical* (EDC) adalah senyawa alami atau sintetis di lingkungan yang dapat mengganggu sintesis hormon dan fungsi fisiologis normal dari organ reproduksi pria dan wanita (Hwang & Choi, 2015). Gangguan pada fungsi reproduksi wanita oleh EDC dapat menyebabkan subfertilitas, infertilitas, gangguan produksi hormon, kelainan siklus menstruasi dan anovulasi (Rattan *et al.*, 2017). Aluminium terakumulasi di kelenjar endokrin dan menyebabkan kerusakan kelenjar melalui stres oksidatif, dengan demikian menurunkan hormon yang disekresikan ke dalam aliran darah untuk bekerja pada organ target yang menyebabkan hipofungsi organ, beberapa penelitian menunjukkan bahwa terdapat kegagalan pada testis dan ovarium (Igbokwe *et al.*, 2019).

Pada tikus setelah dipapar secara oral, aluminium terakumulasi di limpa, hati, tulang, ginjal, jantung dan otak (Igbokwe *et al.*, 2019). Otak adalah salah satu organ yang menjadi sasaran toksisitas aluminium, karena otak merupakan target paling sensitif terhadap kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh tingginya kadar lipid dan konsumsi oksigen jaringan (Vanduyt *et al.*, 2013).

Terdapat dua rute yang memungkinkan Aluminium masuk kedalam otak dari darah yaitu melalui *Blood Brain Barrier* (BBB) dan melalui *choroid plexus* (CP), akan tetapi aluminium lebih cepat masuk kedalam cortex melalui jalur BBB dan kemudian diteruskan kedalam otak (Yokel, 2012)

Aluminium mampu melewati sawar darah otak atau *Blood Brain Barrier* (BBB), sehingga dapat mencapai dan terakumulasi di otak (Tietz *et al.*, 2019).

Masuknya aluminium kedalam otak melalui kompleks transferrin secara kompetitif bersama Fe dengan cara endositosis yang dimediasi reseptor transferrin (TfR) (Sanchez-Iglesias *et al.*, 2009). Peristiwa tersebut menyebabkan terjadinya gangguan homeostasis Fe intraseluler, yang dapat menghambat aktivitas enzim mitokondria dan membatasi produk ATP (Han *et al.*, 2013).

Gangguan homeostasis besi yang disebabkan oleh paparan aluminium juga dapat menyebabkan kelebihan zat besi intraseluler (Igbokwe *et al.*, 2019).

Aluminium dapat merangsang peroksidasi lipid yang dipicu oleh peningkatan zat besi intraseluler melalui reaksi fenton di otak. Reaksi antara Al^{3+} dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan senyawa AlO_2^{2+} , yang kemudian akan meningkatkan stres oksidatif melalui reaksi fenton. Reaksi fenton merupakan reaksi antara Fe^{2+} dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dalam reaksi ini diproduksi Fe^{3+} , Radikal hidroksil (OH^-) dan ion hidroksil (OH^{\cdot}). Radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi fenton merupakan bagian dari ROS yang akan menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan protein (Yuan *et al.*, 2012; Kanti Das *et al.*, 2015).

Produksi ROS yang melebihi kapasitas antioksidan, mengakibatkan sel mengalami stres oksidatif (Drazba, 2019). Secara alamiah tubuh memiliki sistem pertahanan (antioksidan endogen : SOD, CAT, GSH), *Superoxide Dismutase* (SOD) adalah enzim kunci dalam sistem antioksidan dan memainkan peran yang sangat penting dalam inaktivasi ROS (Kumar *et al.*, 2020). Dalam kondisi stres oksidatif SOD berperan sebagai pertahanan lini pertama dengan mengubah superoksida anion (O_2^-) menjadi Hidrogen peroksida (H_2O_2), kemudian dilanjutkan dengan Catalase (CAT) yang akan melakukan konversi H_2O_2 menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Sumathi *et al.*, 2015). Peningkatan peroksidasi lipid (LPO) dapat diartikan sebagai penghambatan aktivitas SOD di otak (Amjad & Umesalma, 2015). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Nehru dan Bhalla

(2005), pemberian aluminium secara oral mengakibatkan penurunan yang signifikan aktivitas SOD di otak, dan penurunan SOD yang paling signifikan diamati di wilayah hipotalamus.

Stres oksidatif yang meningkat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga terjadi gangguan sintesis dan sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) pada hipotalamus. Gangguan ini menyebabkan kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH & LH (Kardi, 2015). Kekurangan hormon FSH pada tikus betina dapat menghambat proses folikulogenesis yang mengakibatkan infertilitas (Coss, 2020). Dilaporkan bahwa pada penelitian yang bertujuan untuk menyelidiki efek paparan aluminium terhadap fungsi reproduksi tikus betina, menunjukkan hasil kadar hormon FSH di serum secara signifikan menurun dan konsentrasi aluminium meningkat setelah diberikan paparan aluminium klorida (AlCl₃) selama 120 hari (Wang *et al.*, 2012).

Pemanfaatan tumbuhan obat memiliki kontribusi yang besar untuk mengobati masalah medis, berbagai tumbuhan diklaim memiliki efek yang baik untuk fertilitas salah satunya adalah *curcuma longa* (Boudou *et al.*, 2020). Kunyit (*Curcuma longa*) memiliki beragam manfaat kesehatan dengan biaya yang murah dan rendahnya efek samping (Okanlawon *et al.*, 2020). kunyit mengandung komponen kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin, dimethoxycurcumin dan bisdemethoxycurcumin (Boudou *et al.*, 2020). Keamanan kurkumin untuk dikonsumsi manusia telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) (Mohebbati *et al.*, 2017).

Kurkumin adalah antioksidan yang efektif untuk melawan kerusakan oksidatif di jaringan, dan secara signifikan menghambat pembentukan ROS (Boudou *et al.*, 2020) serta dapat merangsang enzim antioksidan seperti SOD (Abrahams *et al.*, 2019). Sahebkar *et al.* (2015) melaporkan adanya peningkatan yang signifikan kadar SOD setelah diberikan suplementasi kurkumin selama ≥ 6

minggu. Kurkumin dapat mencegah kerusakan oksidatif di otak dan dapat dijadikan agen yang berguna melawan stres oksidatif di jaringan (Samarghandian *et al.*, 2017).

Akomolafe & Aluki, (2020) melaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan kadar FSH, LH, menurunkan kadar malondialdehyde (MDA) di testis dan menurunkan pembentukan ROS serta menurunkan tingkat kolesterol.

Kurkumin merupakan fitoestrogen yang dapat berinteraksi dengan sistem endokrin serta mempengaruhi sumbu hypothalamus-pituitary-ovarium (HPO) dan mengobati gangguanya (Boudou *et al.*, 2020). Oleh sebab itu kurkumin yang terkandung didalam kunyit mungkin memiliki potensi untuk mencegah terjadinya infertilitas yang disebabkan oleh paparan logam berat pada wanita dengan berperan sebagai antioksidan eksogen, hal ini perlu diteliti lebih lanjut karena penelitian mengenai hal tersebut masih belum banyak dipelajari.

Berdasarkan latar belakang diatas maka peneliti tertarik melakukan studi lebih lanjut mengenai efek antioksidan ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus betina yang dipapar aluminium.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) berpengaruh terhadap kadar superoksida (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) mencegah penurunan kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium?

2. Apakah ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) mencegah penurunan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) berpengaruh terhadap kadar superoksida Dismutase (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) mencegah penurunan kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium
2. Membuktikan pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) mencegah penurunan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Penelitian ini dapat dijadikan sebagai informasi mengenai pengaruh aluminium terhadap perubahan kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), serta sebagai informasi tentang keefektifan ekstrak kunyit sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas yang disebabkan oleh paparan aluminium.

2. Dapat dijadikan sebagai acuan penelitian selanjutnya tentang efek pencegahan yang dihasilkan ekstrak kunyit, terhadap dampak paparan aluminium pada reproduksi wanita

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat kunyit sebagai antioksidan dalam mencegah pengaruh negatif paparan aluminium pada kesehatan reproduksi wanita.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infertilitas

2.1.1 Definisi Infertilitas

Infertilitas adalah penyakit yang ditandai dengan kegagalan untuk hamil setelah 12 bulan teratur melakukan hubungan seksual tanpa menggunakan pelindung atau alat kontrasepsi dan merupakan penyakit yang menimbulkan disabilitas sebagai gangguan fungsi (Vander Borgh & Wyns, 2018). Infertilitas diklasifikasikan sebagai penyakit sistem reproduksi oleh *World Health Organization* (WHO) (Martins *et al.*, 2020).

Selanjutnya Infertilitas dikategorikan sebagai infertilitas primer dan sekunder (Benksim *et al.*, 2018). Infertilitas primer adalah ketika pasangan usia subur belum pernah mengalami kehamilan setelah aktif melakukan hubungan seksual tanpa menggunakan alat kontrasepsi (Martins *et al.*, 2020), sedangkan Infertilitas sekunder adalah ketidak mampuan untuk hamil pada pasangan usia subur yang sebelumnya sudah pernah hamil (Benksim *et al.*, 2018), pada infertilitas sekunder setidaknya sudah ada satu konsepsi sebelumnya akan tetapi gagal berulang (Abebe *et al.*, 2020).

2.1.2 Penyebab Infertilitas

Infertilitas dapat disebabkan oleh berbagai faktor seperti faktor anatomis, fisiologis dan genetik. Etiologi dan prevalensi infertilitas di berbagai daerah berbeda-beda, hal tersebut disebabkan perbedaan kondisi lingkungan yang berhubungan dengan perilaku reproduksi, seperti usia menikah, pencemaran lingkungan oleh bahan kimia, penyalahgunaan rokok dan alkohol serta gaya hidup yang berbeda (Masoumi *et al.*, 2015).

Etiologi infertilitas pada wanita sangat beragam dan mencakup beberapa faktor seperti mutasi genetik, kelainan kromosom, faktor gaya hidup, kelainan pada saluran tuba, endometriosis dan gangguan ovulasi (Bala *et al.*, 2020).

Penyebab paling umum pada gangguan ovulasi adalah disfungsi hipotalamus (35%), gangguan pada hipofisis (15%) dan disfungsi ovarium (50%) (Barbieri, 2019).

Menurut *National Collaborating Centre For Women's and Children's Health (UK)* (2013) gangguan ovulasi adalah penyebab utama infertilitas pada wanita yang diklasifikasikan kedalam tiga kategori oleh WHO yaitu :

1. Gangguan Ovulasi kelompok I (*Hypothalamic Pituitary Failure*)

Kegagalan hipotalamus-hipofisis (HPF) bermanifestasi sebagai hipogonadotropik hipogonadisme. Wanita dengan HPF biasanya ditandai dengan pubertas yang tertunda atau terganggu, amenore primer atau sekunder dan infertilitas. Penyebab tersering dari HPF adalah karena tidak adanya *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) bawaan. Penyebab lainnya adalah *panhypopituitarism* yang ditandai defisiensi 50% hormon yang disekresikan oleh kelenjar pituitari, melibatkan nekrosis jaringan, hipofisis autoimun, adenoma hipofisis atau tumor otak yang berdekatan. Trauma kepala yang signifikan dapat mempengaruhi produksi hormone dari hipofisis anterior (Mikhael *et al.*, 2019).

2. Gangguan Ovulasi kelompok II (*Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Dysfunction*)

Kelompok ini merupakan disfungsi ovulasi eugonad yang menyebabkan sebagian besar gangguan ovulasi yang terdiri dari berbagai macam gangguan.

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) adalah penyebab anovulasi yang paling umum. Beberapa mekanisme yang menggambarkan pathogenesis PCOS termasuk hilangnya pulsasi GnRH dengan peningkatan sekresi LH oleh kelenjar pituitary, hiperinsulinemia, retensi insulin ovarium, disfungsi sel teka dan hiper

androgenisme. Selanjutnya, Berat badan yang ekstrim mempengaruhi regulasi ovulasi dan mengganggu mekanisme endokrin dan parakrin. Endokrinopati, hiperprolaktinemia juga merupakan penyebab umum disfungsi ovulasi (Mikhael *et al.*, 2019).

3. Gangguan ovulasi kelompok III (*Ovarian Failure*)

Gangguan ovulasi kelompok III didefinisikan sebagai insufisiensi atau kegagalan ovarium dengan profil hipergonadotropik-hipogonadik yang mempengaruhi 5% wanita dengan disfungsi ovulasi (Mikhael *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan bahan kimia yang berkepanjangan seperti *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDCs) dalam bentuk pestisida, pupuk dan produk industri (plasticizer dan fitoestrogen) dikaitkan dengan infertilitas dengan cara mengganggu berbagai jalur hormonal (Ding *et al.*, 2016). EDCs dapat mengganggu kerja hormon baik pada reseptor hormon atau dapat merubah jumlah reseptor hormon didalam sel (Hart, 2016). Paparan lain dapat dikarenakan oleh polusi udara, logam berat dan radiasi yang dapat menyebabkan infertilitas atau peningkatan kecenderungan komplikasi kehamilan seperti abortus yang berulang (Bala *et al.*, 2020).

2.2 Aluminium (Al)

2.2.1 Definisi Aluminium

Aluminium adalah suatu unsur kimia dengan lambang (Al) memiliki nomor atom 13 dan standar berat atom 29,68. Dalam tabel periodik unsur Al termasuk dalam golongan III, aluminium berwarna putih keperakan, lentur, mudah dibentuk dan non magnetic (Drazba, 2019). Aluminium merupakan unsur terbanyak ketiga yang ada dikerak bumi dengan proporsi 8% setelah oksigen (47%) dan silikon (28%) (Ajibade *et al.*, 2019), Al terlalu reaktif secara kimiawi sehingga tidak ditemukan dalam bentuk bebas, akan tetapi dalam bentuk kombinasi dengan

unsur lain seperti hidroksida, klorida, silikat, sulfat dan fosfat (Sharma *et al.*, 2015).

Al tersedia dalam bentuk kation trivalent (Al^{3+}) (Hardisson *et al.*, 2017).

Aluminium dapat berikatan dengan senyawa yang mengandung oksigen dan nitrogen, terutama pada fosfat organik dan anorganik, melalui interaksi ini

Aluminium dapat mengikat banyak makromolekul biologis. Meskipun Al banyak

ditemukan di lingkungan, tidak ada peran penting Al dalam sistem kehidupan,

secara umum Al memberikan efek buruk pada pertumbuhan dan reproduksi,

bahkan akumulasi aluminium dalam jaringan dan organ dapat menyebabkan

toksitas (Drazba, 2019).

2.2.2 Aluminium Klorida

Aluminium klorida ($AlCl_3$) adalah senyawa kimia utama dari aluminium (Al^{3+}) dan klorin (Cl). Senyawa ini berwarna putih, akan tetapi terkontaminasi

dengan besi triklorida yang akan memberikan pewarnaan kuning. ($AlCl_3$)

merupakan asam lewis yang paling banyak digunakan, senyawa ini banyak

ditemukan dalam aplikasi industri kimia sebagai katalis, produk pentingnya

adalah deterjen dan etilbenzena (Desytasmania, 2018). Aluminium klorida dapat

memicu peningkatan radikal bebas pada berbagai organ seperti otak, hati dan

ginjal (Newairy *et al.*, 2009). Paparan ($AlCl_3$) dapat menyebabkan neurotoksisitas

melalui mekanisme stres oksidatif. Senyawa ($AlCl_3$) dapat mencapai sirkulasi

sistemik yang pada akhirnya akan terakumulasi di dalam otak. Di otak ($AlCl_3$)

menginduksi respon inflamasi yang menyebabkan kelainan struktur dan

mengakibatkan neurodegeneration (Amjad & Umesalma, 2015).

Salah satu bentuk dari aluminium adalah aluminium klorida yang mempunyai karakteristik sebagai berikut (Helmboldt *et al.*, 2007):

Nama Lain: Aluminium (III) Klorida, Aluminium triklorida

Rumus Kimia: $AlCl_3$

Massa Molar : 133,34 g/mol (anhidrat), 241,43 g/mol (heksahidrat)

Penampilan : Padatan putih atau kuning pucat

Titik lebur : 192.4°C (anhidrat), 100°C (heksahidrat)

Titik didih : 120°C

Kepadatan : 2.48 g/cm³

Kelarutan dalam air : 43.9 g/100 ml (0°C)

45.8 g/100 ml (0°C)

47.3 g/100 ml (0°C)

48.1 g/100 ml (0°C)

48.6 g/100 ml (0°C)

49 g/100 ml (0°C)



Gambar 2.1 Aluminium Klorida (AlCl₃)

2.2.3 Paparan Aluminium Pada Manusia

Aluminium merupakan salah satu elemen paling melimpah di kerak bumi dan kegunaannya yang bermacam-macam menyebabkan populasi terpapar dari berbagai sumber (Tietz *et al.*, 2019). Aluminium tersebar luas di alam, udara, air, dan tumbuhan (Rezaee *et al.*, 2010). Sumber utama keterpaparan aluminium pada manusia dan hewan adalah makanan. Sumber tambahan untuk manusia termasuk minuman, polusi udara, obat-obatan, kosmetik, dan vaksin dengan Al

sebagai adjuvan (Yokel, 2020). kosmetik dan produk perawatan tubuh seperti antiperspirant, pasta gigi, dan tabir surya juga dapat menjadi sumber paparan karena aluminium dapat diserap melalui kulit (Tietz *et al.*, 2019).

2.2.3.1 Paparan Melalui Makanan dan Peralatan Masak

Makanan merupakan sumber paparan aluminium yang paling utama. Kandungan aluminium dalam makanan sangat bervariasi, tergantung kandungan alami di dalam makanan tersebut, penggunaan zat aditif, dan interaksi makanan dengan peralatan masak atau kemasan (Vignal *et al.*, 2016). Penggunaan pestisida dapat menyebabkan residu pada makanan. Banyak makanan yang tidak diolah seperti buah, sayur, sereal dan coklat mengandung aluminium (Tietz *et al.*, 2019). Konsentrasi aluminium yang besar ditemukan di kayu manis, oregano, paprika, kacang-kacangan, kentang dan coklat (kakao) (Stahl *et al.*, 2018). Aluminium juga terkandung dalam peralatan masak dan sebagai elemen atau kontaminan yang muncul pada beberapa makanan dan minuman seperti *sea food*, susu, *wine* dan teh (Niu, 2018).

Saat ini berkembang metode baru dalam pemrosesan, penyimpanan, dan pengemasan makanan dimana menyebabkan peningkatan penggunaan aluminium disektor makanan (Grebler & Fries, 2014). Transfer aluminium atau pelepasan aluminium dari peralatan masak ke makanan tergantung pada pH, durasi memasak dan penambahan gula dan garam. Pembuatan produk asam seperti saus tomat yang menggunakan material aluminium akan menghasilkan pelepasan aluminium dalam jumlah besar. Penggunaan aluminium foil juga dapat menyebabkan migrasi aluminium ke makanan bergantung pada suhu ketika memasak, nilai PH dan kandungan garam (Stahl *et al.*, 2018). *The Food and Agriculture Organization (FAO)* merekomendasikan asupan aluminium per minggu yang dapat ditoleransi adalah 1 mg/kg, karena memiliki dampak negatif bagi sistem reproduksi dan perkembangan syaraf (Dolara, 2014).

Tabel 2.1 Rentang konsentrasi aluminium dalam makanan

No	Rentang Konsentrasi Aluminium	Makanan
1.	≤ 5.00 mg/kg	Makanan yang tidak diolah
2.	5.00-10.00 mg/kg	Roti, adonan kue pastry, tepung Sayuran: Jamur, bayam, lobak, selada Manisan buah
3.	≥ 10.0 mg/kg	Produk hewani : Susu, sosis, seafood Daun teh, koka, kopi

Keterangan : Rentang konsentrasi Al dalam beberapa sumber makanan (Stahl *et al.*, 2018)

2.2.3.2 Paparan Melalui Air Minum

Pengasaman tanah yang disebabkan oleh hujan asam adalah penyebab pelepasan aluminium dalam bentuk ionic (Al^{3+}) ke sistem akuatik, dan (Al^{3+}) sangat larut dalam air, sehingga akan menyebabkan pencemaran perairan.

Kadar aluminium dalam air minum juga dapat meningkat apabila menggunakan senyawa berbasis aluminium dalam pengolahan air minum (Hardisson *et al.*, 2017). Paparan aluminium melalui air minum sekitar 30 $\mu g/kg$ BB dalam sehari (Vignal *et al.*, 2016). Minuman dari kaleng aluminium umumnya mengandung kadar aluminium yang lebih tinggi dibandingkan minuman dari botol kaca (Sjogren *et al.*, 2015).

Jumlah aluminium di perairan alami bervariasi dari 0,0001 hingga 1 mg/dm^3 , dan di perairan asam ($pH < 5$) konsentrasi aluminium lebih dari 100 mg/dm^3 . Pengolahan air menggunakan aluminium sulfat dapat menyebabkan peningkatan tingkat kelarutan, berat molekul rendah, spesies polialuminium yang secara kimiawi reaktif dan mungkin lebih mudah diserap (Krupinska, 2020).

$Al_2(SO_4)_3$ sering digunakan sebagai koagulan untuk menghilangkan materi partikulat di air minum, dengan demikian kadar aluminium dalam air minum akan meningkat, jumlah yang sangat besar ditemukan dalam teh dan kopi (Stahl *et al.*, 2018). konsumsi aluminium yang melebihi ambang batas normal dapat menimbulkan potensi resiko bagi kesehatan manusia (Krupinska, 2020). Telah ditemukan bahwa ion aluminium dari air dapat berdifusi kedalam plasma darah

yang menyebabkan kerusakan sistem saraf, dan penetrasi ion melalui *Blood Brain Barrier* (BBB) bergantung pada derajat ionisasi, kelarutan lemak dan ukuran molekul (Chao *et al.*, 2020).

The Environmental Protection Agency (EPA) pada tahun 2017 merekomendasikan *Secondary Maximum Contaminant Level* (SMCL) untuk aluminium di dalam air minum adalah 0,05-0,2 mg/dm³ (Krupinska, 2020). WHO merekomendasikan batas maksimal aluminium di dalam air minum harus lebih rendah dari 0,2 mg/dm³ (WHO, 2017). Di Indonesia ambang batas aman kandungan aluminium pada air minum adalah 0,2 mg/l (Kemenkes RI, 2016).

2.2.3.3 Paparan Melalui Udara

Udara merupakan penyumbang yang signifikan bagi paparan aluminium ke manusia. Sumber partikel yang mengandung aluminium di udara berasal dari debu tanah dan bebatuan. Sumber materi partikulat yang mengandung aluminium termasuk pembakaran batubara, emisi kendaraan bermotor dan kegiatan industri (Igbokwe *et al.*, 2019). Kandungan aluminium pada udara bersih sebesar 100 ng/m³, dan meningkat pada daerah industri sebesar 0,4-8 µg.

Partikel berbasis aluminium dari berbagai ukuran, bentuk dan komposisi merupakan komponen utama aerosol, apabila terdapat 100 ng Al/m³ di udara bebas maka paparan aluminium melalui pernafasan normal kurang lebih 1,4 mg/hari. Paparan aluminium melalui pernafasan juga dapat berasal dari kegiatan industri, merokok, penggunaan ganja, kokain dan heroin (Exley, 2013).

Aluminium juga digunakan dalam produksi kendaraan pengangkut, seperti mobil, bus, kereta api dan pesawat terbang, bahan bangunan, konstruksi pengemasan dan peralatan listrik (Niu, 2018).

2.2.3.4 Penggunaan Aluminium Dalam Bidang Farmasi

Aluminium telah lama digunakan dalam bidang medis misalnya digunakan sebagai adjuvan dalam vaksin dan untuk menanggulangi hiperdosis

dengan efek samping yang rendah (Klotz *et al.*, 2017). Manusia dan hewan terpapar obat-obatan yang mengandung aluminium seperti pengikat fosfat, antasida, buffered analgesic, dan obat antidiare. Paparan aluminium mungkin dapat melalui penghirupan aerosol, menelan obat atau dengan pemberian parenteral. Penggunaan lainnya seperti pasta gigi, desinfektan, fumigant, pestisida, dan beberapa kosmetik juga merupakan sumber paparan aluminium (Igbokwe *et al.*, 2019).

2.2.4 Toksikokinetik Aluminium

2.2.4.1 Absorpsi

Beberapa bagian tubuh seperti kulit, hidung, paru-paru dan saluran gastrointestinal merupakan rute dari penyerapan aluminium kedalam tubuh (Exley, 2013). Penghirupan dan *ingestion* (melalui makanan dan air minum) adalah dua jalur utama yang dilalui aluminium masuk kedalam tubuh. Absorpsi dan eliminasi menentukan tingkat akumulasi aluminium jaringan dan perkembangan toksisitasnya (Igbokwe *et al.*, 2019).

Kosmetik, produk kulit, rambut, dan perawatan tubuh lainnya yang diaplikasikan secara topikal merupakan salah satu sumber paparan aluminium yang signifikan. Epidermis luar adalah lapisan sel yang banyak mengandung keratin, dan sebagian besar mengandung lipid. Penggunaan produk seperti antiperspirant, tabir surya, *body cream*, *tanning lotion*, termasuk produk bibir yang mengandung aluminium, akan berdifusi secara pasif menggunakan rute trans dan paraseluler. Akan tetapi, hanya sebagian kecil aluminium dalam antiperspirant yang dioleskan secara topical memasuki aliran darah dan akhirnya dikeluarkan melalui ginjal (Exley, 2013).

Pada saat aluminium memasuki rongga hidung, sebagai partikulat yang terbawa udara, partikel tersebut masuk kedalam epitel pernafasan atau epitel olfaktorius. Setelah aluminium diserap oleh epitel pernafasan ke saraf olfaktori

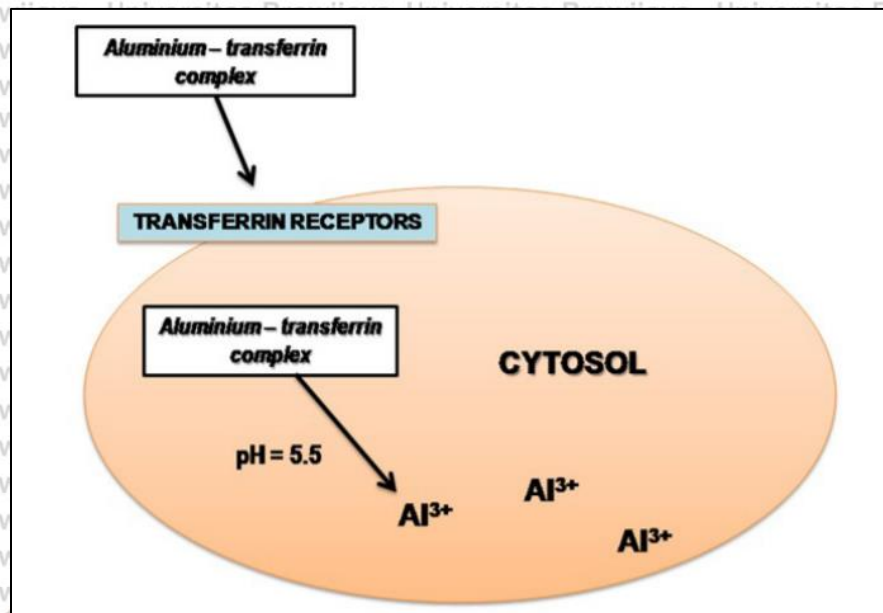
dapat didistribusikan langsung ke otak (Exley, 2013). Setelah terhirup, senyawa aluminium akan tersimpan didalam paru-paru. Aluminium secara terus-menerus terakumulasi didalam paru-paru dalam bentuk partikel aluminium silikat dan senyawa sulit larut. Konsentrasi aluminium di paru-paru cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya usia dan dapat menyebabkan gangguan pada pernafasan (Igbokwe *et al.*, 2019). Absorpsi aluminium melalui pernafasan masih belum banyak dipelajari, namun diperkirakan penyerapannya adalah 1,5-2% (Tietz *et al.*, 2019). Manusia terpapar aluminium melalui pernafasan normal sekitar 4,4 µg dalam sehari (Exley, 2013).

Paparan aluminium secara oral pada manusia terutama melalui makanan, minuman dan obat-obatan (Vignal *et al.*, 2016). Absorpsi pada gastrointestinal merupakan jalur utama dimana aluminium akan terakumulasi secara sistemik pada hewan dan manusia, sebagian besar proses absorpsi ini terjadi di duodenum (Igbokwe *et al.*, 2019). Penyerapan aluminium melalui jalur gastrointestinal bersifat kompleks dan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis senyawa aluminium, pH, banyaknya senyawa aluminium yang tertelan, kalsium, zat besi, dan adanya senyawa lain (Tietz *et al.*, 2019). Tempat penyerapan aluminium adalah usus bagian atas, mekanisme absorpsi aluminium di gastrointestinal terjadi secara transport aktif dan pasif, melintasi sel-sel usus dan berdifusi secara paraseluler. Penyerapan aluminium meningkat yang dimediasi oleh proses penyerapan kalsium. Sitrat dapat meningkatkan absorpsi aluminium melalui jalur paraseluler dengan meningkatkan permeabilitas antar sel (Sjogren *et al.*, 2015). Penyerapan aluminium pada saluran pencernaan dapat meningkat dengan adanya maltol, laktat, sitrat dan fluoride di dalam makanan atau air minum. Absorpsi aluminium dari asupan air sekitar 0,3% lebih besar dari pada dari makanan kurang lebih 0,1% (Igbokwe *et al.*, 2019).

2.2.4.2 Distribusi

Setelah proses absorpsi atau penyerapan, aluminium didistribusikan ke berbagai jaringan dan organ (Sjogren *et al.*, 2015). Aluminium dapat terakumulasi pada tulang, otot, ginjal, otak, dan paru-paru (Tietz *et al.*, 2019). Total beban aluminium tubuh manusia sehat diperkirakan 30-50 mg/kg berat badan, dan kadar normal aluminium dalam serum sekitar 1-3µg/L, kurang lebih satu setengah dari total aluminium tubuh ada di dalam kerangka, dan kadar aluminium dalam jaringan berkisar 5-10 mg/kg (Igbokwe *et al.*, 2019).

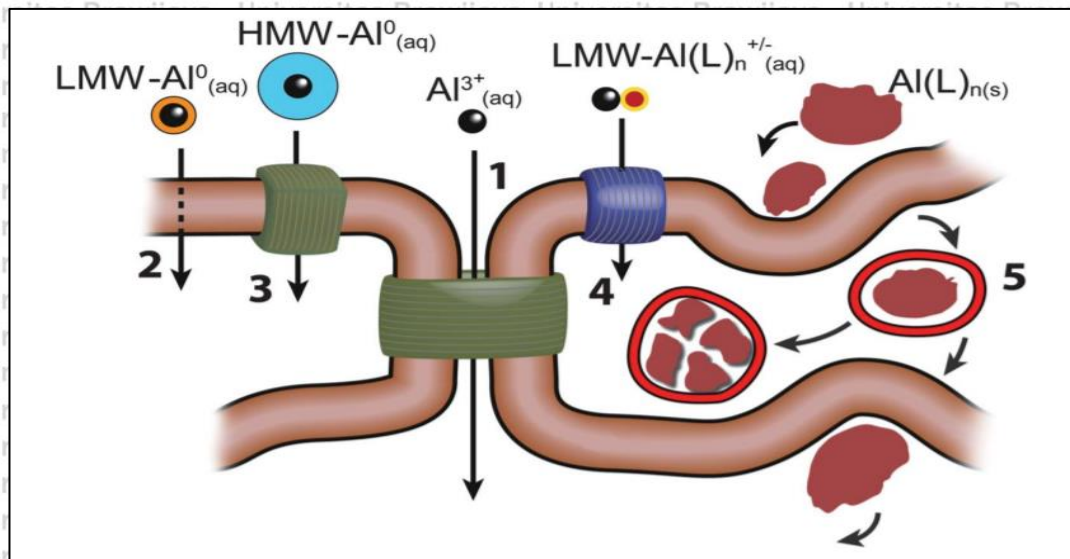
Kandungan aluminium di tulang dan otak meningkat seiring bertambahnya usia. Otak memiliki konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan jaringan lainnya (Sjogren *et al.*, 2015), akan tetapi otak merupakan target paling sensitif terhadap kerusakan oksidatif karena tingginya kadar lipid dan konsumsi oksigen jaringan (Vanduyt *et al.*, 2013). Aluminium telah terbukti dengan cepat memasuki otak, cairan ekstraseluler dan cairan serebrospinal. Kurang lebih 90% aluminium yang bersirkulasi di dalam darah terikat pada transferrin (protein pengikat besi), sedangkan aluminium sisanya terikat pada albumin dan sitrat (Igbokwe *et al.*, 2019). Salah satu mekanisme masuk dan terakumulasinya aluminium di dalam otak adalah melewati *Blood Brain Barrier* (BBB) (Tietz *et al.*, 2019), masuknya aluminium yang terikat pada transferrin kedalam otak secara endositosis yang dimediasi oleh reseptor transferrin (Sjogren *et al.*, 2015). Transferrin bersifat nonselektif, sehingga dapat terjadi kompetisi antara aluminium dengan besi untuk berikatan di *binding site*. Aluminium dapat berikatan dengan *iron binding site* pada transferrin sehingga aluminium akan berikatan pada sisi yang sama dengan Fe^{3+} (Adityanti, 2018). Aluminium tersedia dalam bentuk ionik yaitu Al^{3+} . Al^{3+} memiliki keadaan oksidatif yang sama dengan Fe^{3+} , hal ini juga yang menyebabkan aluminium dapat berikatan dengan transferrin (Hardisson *et al.*, 2017).



Gambar 2.2 Transferrin Pathway

Keterangan: Aluminium berikatan dengan molekul transferrin dan kompleks aluminium-transferrin akan mengikat reseptor transferrin untuk memasuki sel. Di dalam sel terjadi penurunan pH menjadi 5,5 kemudian Al³⁺ akan dilepaskan dari kompleks (Hardisson *et al.*, 2017).

Darah merupakan salah satu agen pendistribusi utama aluminium, akan tetapi terakumulasinya jumlah aluminium yang signifikan di dalam keringat menunjukkan bahwa sistem limfatik juga berperan dalam transport aluminium ke seluruh tubuh. Terdapat 5 rute utama dimana aluminium dapat melintasi membrane sel atau sel epitel dan endotel yaitu dengan cara paraseluler, transeluler, transport aktif, kanal dan endositosis adsorptif atau dimediasi reseptor (Exley, 2013).



Gambar 2.3 Rute utama aluminium masuk kedalam membrane sel

Keterangan : (1) Aluminium kation trivalent terlarut bebas ($Al^{3+}_{(aq)}$) melintasi sel endotel melalui jalur paraseluler; (2) Aluminium *low molecular weight*, netral, kompleks erlarut ($LMW-Al^0_{(aq)}$) melintasi sel endotel dengan jalur transeluler; (3) Aluminium *high molecular weight*, netral, kompleks terlarut ($HMW-Al^0_{(aq)}$) akan melintasi sel endotel dengan cara transport aktif; (4) Aluminium *low molecular weight*, bermuatan $+/-$, kompleks terlarut ($LMW-Al(L)_n^{+/-}_{(aq)}$) melintasi kanal io; (5) Aluminium nano dan mikro partikel ($Al(L)_n(s)$) masuk dengan endositosis adsortif atau dimediasi reseptor.
Sumber : (Exley, 2013)

2.2.4.3 Metabolisme

Ion Al^{3+} dapat berikatan dengan makromolekul intraseluler dan berpotensi menyebabkan jejas pada sel. Reaksi metabolisme aluminium yaitu konjugasi dengan glutation menggunakan enzim glutation transferase (GST) yang terdapat dalam jumlah besar di sitosol hepar (Adityanti, 2018).

2.2.4.4 Ekskresi

Akumulasi aluminium di jaringan dapat berkurang karena adanya sitrat dan fluoride melalui ekskresi ginjal, ketika jumlah ikatan aluminium-transferin di dalam darah sudah melampaui batas (Igbokwe *et al.*, 2019). Ginjal mengekskresikan aluminium sejumlah 15-55 μg /hari melalui urin dan feses (Hardisson *et al.*, 2017). Urine menyumbang lebih dari 95% ekskresi aluminium, penurunan fungsi ginjal dapat meningkatkan akumulasi aluminium. Chelators dapat meningkatkan pembersihan aluminium, dan sitrat bertindak sebagai

chelator (Sjogren *et al.*, 2015). Aluminium juga dapat diekskresikan dalam ASI, empedu, feses, keringat, rambut, kuku, sebum dan semen. Mayoritas aluminium yang masuk ke saluran pencernaan akan diekskresikan dalam feses (Exley, 2013). Setelah injeksi aluminium sitrat intravena, waktu paruh di darah, tulang dan kortikal masing-masing adalah 1 jam, 1,4 tahun dan 29 tahun (Sjogren *et al.*, 2015).

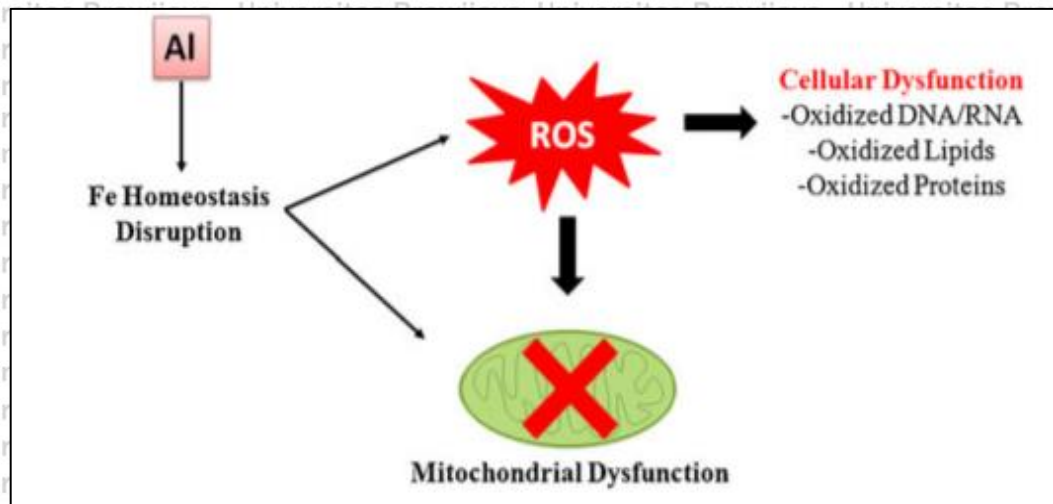
2.2.5 Mekanisme Toksisitas Aluminium

Toksisitas aluminium pada umumnya disebabkan oleh terganggunya homeostasis pada logam seperti magnesium (Mg), kalsium (Ca) dan zat besi (Fe), aluminium dapat meniru fungsi biologis dari logam-logam tersebut sehingga memicu banyak perubahan biokimia (Exley, 2016). Al^{3+} memiliki jari-jari ionic yang relatif kecil (50 pm) dengan 3 muatan positif, ciri-ciri tersebut memungkinkan aluminium menjadi *cross-linker* yang efektif pada protein (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). Aluminium mengganggu metabolisme energi, karena ukuran Al^{3+} mirip dengan kofaktor alami Mg^{2+} , maka Al^{3+} dapat menggantikan ion Mg^{2+} dalam beberapa proses vital seperti polimerisasi tubulin menjadi mikrotubulus. Mg^{2+} berfungsi sebagai kofaktor dengan mengikat fosfat guanosin trifosfat (GTP), dan Al^{3+} dapat menggantikan peran tersebut. Semua reaksi terkait ATP menggunakan Mg^{2+} dan Al^{3+} berpotensi mengganggu proses tersebut (Drazba, 2019). Al telah terbukti menggantikan Mg dan mengikat gugus fosfat pada membrane sel, DNA dan ATP (Han *et al.*, 2013).

Aluminium adalah logam beracun yang dapat berinteraksi dengan logam lainnya, aluminium berinteraksi dengan kalsium dalam sistem rangka (Drazba, 2019), dalam proses absorpsi aluminium bersaing dengan kalsium, sehingga apabila terjadi peningkatan jumlah aluminium dapat mengurangi mineralisasi di kerangka atau disebut dengan *osteopenia* (Bao *et al.*, 2015). Al^{3+} menghambat proses biologis yang melibatkan pertukaran Ca^{2+} , *exchange rate* Al^{3+} 10^8 lebih

lambat dibandingkan dengan Ca^{2+} , hal tersebut dapat meningkatkan waktu paruhnya dalam tubuh manusia. Al^{3+} menghambat saluran ion Ca^{2+} dan reseptor neurotransmitter sehingga dapat merusak transmisi sinaptik. Al^{3+} dapat menghambat berbagai saluran Ca^{2+} dan mempengaruhi homeostasisnya (Kawahara & Kato-Negishi, 2011).

Aluminium memiliki karakteristik yang mirip dengan besi (Fe) sehingga dapat mengikat protein pengikat Fe seperti ferritin, transferrin dan *iron regulator protein* (IRP). IRP dan *iron regulatory element* (IRE) mengatur produksi pengikatan besi-protein untuk mencegah pembentukan Fe^{2+} bebas yang merupakan penyebab radikal bebas. Dalam kondisi kekurangan zat besi, IRP akan berikatan dengan IRE dan mengatur ekspresi gen yang mengandung IRE dalam mRNA seperti ferritin dan transferrin. Al^{3+} juga akan mengikat IRP dan dengan demikian mempengaruhi ekspresi protein pengikat Fe dengan IRE di mRNA, hal ini menyebabkan peningkatan konsentrasi Fe, sehingga Al^{3+} dapat mempengaruhi homeostasis besi. Aluminium menyebabkan peningkatan ekspresi *Amyloid precursor protein* (APP). APP memiliki aktivitas ferrokسيدase yang mengubah Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , dan mengatur konsentrasi Fe^{2+} prooksidan bebas. Al^{3+} merangsang peroksidasi lipid membrane yang diinduksi Fe dan menyebabkan kerusakan oksidatif in vitro dan in vivo (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). Efek aluminium pada homeostasis besi membuat logam ini beracun, karena interaksi tersebut meningkatkan kumpulan Fe bebas pada intraseluler yang akan menginduksi pembentukan *reactive oxygen species* (ROS). Aluminium menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan perubahan status redoks. Oleh karena itu aluminium menimbulkan toksiknya dengan menciptakan lingkungan oksidatif intraseluler, yang dapat menimbulkan berbagai komplikasi dan penyakit (Han *et al.*, 2013).



Gambar 2.4 Toksisitas aluminium mengganggu homeostasis Fe

Keterangan : Aluminium dapat mengganggu homeostasis Fe dan menyebabkan peningkatan Fe bebas pada intraseluler yang dapat menginduksi pembentukan ROS yang dapat mengoksidasi DNA/RNA, lipid dan protein. Mitokondria merupakan organel yang memiliki banyak Fe, sehingga paparan aluminium yang mengganggu homeostasis Fe dapat menyebabkan disfungsi pada mitokondria.

Sumber : (Han *et al.*, 2013)

2.2.6 Paparan Aluminium Pada Otak Menginduksi Stres Oksidatif

Aluminium dapat memasuki otak melalui beberapa rute yaitu dari darah, baik melalui pleksus koroid atau melintasi *Blood Brain Barrier* (BBB) dan dari rongga hidung ke saraf penciuman kemudian didistribusikan langsung ke otak (Crisponi *et al.*, 2013). Al^{3+} dapat memasuki sistem saraf melintasi BBB dengan cara endositosis yang dimediasi reseptor transferrin. Kurang lebih 0,005% aluminium memasuki otak dengan cara tersebut (Drazba, 2019). Karakteristik aluminium yang mirip dengan besi (Fe), sehingga aluminium secara kompetitif bersama Fe berikatan dengan transferrin memasuki sel otak melewati BBB (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). Paparan aluminium menyebabkan gangguan homeostasis besi yang menyebabkan kelebihan zat besi, hal tersebut menghasilkan peroksidasi lipid, lesi DNA dan apoptosis yang disebabkan oleh ROS. Peningkatan kadar zat besi bebas di dalam sel juga disebabkan oleh aluminium yang mampu menurunkan sintesis ferritin dan meningkatkan ekspresi reseptor transferrin dengan ferritin, hal tersebut mengakibatkan peningkatan

kerusakan oksidatif melalui reaksi fenton (Igbokwe *et al.*, 2019). Produksi ROS yang diinduksi aluminium adalah mediator dari kerusakan pada otak (Han *et al.*, 2013). Reaksi antara Al^{3+} dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan senyawa AlO_2^{2+} kemudian AlO_2^{2+} akan mengubah Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} , kompleks aluminium-superoksida dapat meningkatkan stres oksidatif di lingkungan biologis dengan bertindak sebagai agen pemicu reaksi fenton. Reaksi fenton merupakan reaksi antara Fe^{2+} dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dalam reaksi ini diproduksi Fe^{3+} , Radikal hidroksil (OH^{\cdot}) dan ion hidroksil (OH^-). Radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi fenton merupakan bagian dari ROS yang akan menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan protein (Yuan *et al.*, 2012; Kanti Das *et al.*, 2015).

Jaringan otak sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif dikarenakan tingginya tingkat konsumsi oksigen (20%), adanya asam lemak tak jenuh ganda yang melimpah di membran sel, tingginya kandungan besi (Fe) dan aktivitas enzim anti oksidan yang rendah. Aluminium dapat menyebabkan kerusakan oksidatif melalui beberapa mekanisme (Yuan *et al.*, 2012). Aluminium menyebabkan disfungsi mitokondria karena menghasilkan radikal bebas berlebihan yang selanjutnya merusak biomolekul lain termasuk deoksiribonukleat dan meningkatkan *Lipid Peroxidation* (LPO) (Igbokwe *et al.*, 2019). Peningkatan LPO dan penurunan enzim antioksidan merupakan indikator ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan. Dalam kondisi stres oksidatif, SOD memberikan pertahanan pertama melawan superoksida dengan cara mengubah anion superoksida menjadi H_2O_2 dan O_2 . Peningkatan LPO diartikan sebagai penghambatan aktivitas SOD, CAT, dan GPx di otak yang menyebabkan kerusakan membran (Amjad & Umesalma, 2015). Paparan aluminium menginduksi stres oksidatif di otak yang mempengaruhi aktifitas *superoxide Dismutase* (SOD), Catalase (CAT), *Glutathione peroxide* (GPx), dan *glutathione*

(GSH) (Igbokwe *et al.*, 2019). Pada penelitian yang dilakukan oleh Amjad dan Umeselma (2015) setelah diberikan paparan Aluminium klorida ($AlCl_3$) selama 60 hari pada tikus menyebabkan peningkatan LPO, menurunkan level SOD, CAT, GSH dan *glutathione-S-transferase* (GST), pada beberapa bagian otak yaitu Cerebral Cortex, Striatum, Hipotalamus and Hippocampus.

2.2.7 Paparan Aluminium pada Reproduksi Wanita

Sistem reproduksi wanita merupakan sistem multi organ kompleks yang membutuhkan lingkungan biologis yang optimal. Ketidakseimbangan antara antioksidan dan produksi ROS dapat menyebabkan perkembangan proses patologis yang mempengaruhi reproduksi wanita (Anacletus & Onyegeme-Okerenta, 2016). Reproduksi wanita diatur oleh beberapa hormon dan rentan terhadap paparan bahan kimia yang mengganggu endokrin (Rattan *et al.*, 2017).

Aluminium dapat menjadi *endocrine disruptor* apabila digunakan secara terus menerus (Gorgogietas *et al.*, 2018). *Endocrine disrupting chemical* (EDC) adalah bahan kimia eksogen yang mengganggu sintesis, sekresi, transportasi, metabolisme, pengikatan, *action*, dan eliminasi hormon yang berperan atas homeostasis, reproduksi dan proses perkembangan. EDC juga dapat mengganggu fungsi fisiologis organ reproduksi wanita (Hwang & Choi, 2015).

Gangguan reproduksi wanita yang disebabkan oleh EDC adalah subfertilitas, gangguan produksi hormone, kelainan siklus menstruasi, anovulasi, dan penuaan dini pada reproduksi, gangguan tersebut dapat melalui jalur hypothalamus-pituitary (Rattan *et al.*, 2017). Hipotalamus-pituitary-ovarium (HPO) axis adalah suatu sistem yang mengatur reproduksi wanita dengan memproduksi hormon gonadotropik dan steroid. Disfungsi dari HPO axis akan menyebabkan gangguan pada ovulasi yang berpengaruh pada infertilitas (Mikhael *et al.*, 2019).

Aluminium diklasifikasikan sebagai logam yang beracun dan dapat terakumulasi di otak. Deposisi dapat terjadi di seluruh bagian otak, karena

aluminium dapat melewati sawar darah otak. Gangguan steroidogenesis dapat timbul melalui pengendapan aluminium di hipotalamus dan kelenjar pituitari (Miska-Schramm *et al.*, 2017). Paparan aluminium menyebabkan peroksidasi lipid di beberapa daerah otak yaitu otak besar, otak kecil, hipotalamus dan medulla oblongata yang akan menyebabkan stres oksidatif. Paparan aluminium juga menyebabkan penurunan aktivitas SOD di otak, dan penurunan yang paling signifikan terjadi pada daerah hipotalamus (Nehru & Bhalla, 2006). Hipotalamus mengontrol sintesis dan pelepasan *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang berperan pada hipofisis, merangsang pelepasan hormone *luteinizing Hormone* (LH) dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang bekerja pada ovarium dan testis, sebagai pemicu maturasi gonad, gametogenesis, dan steroidogenesis (Zhang, Li, *et al.*, 2016). Stres oksidatif yang meningkat dapat menyebabkan gangguan sintesis dan sekresi GnRH oleh hipotalamus, dan gangguan tersebut berdampak pada kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH dan LH (Kardi, 2015). Stres oksidatif yang berlangsung dalam jangka panjang juga menyebabkan penurunan kualitas folikel dan penurunan fungsi ovarium (Steller *et al.*, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2012) bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan aluminium terhadap fungsi reproduksi pada tikus betina, menunjukkan hasil kadar estrogen, progesterone, FSH dan LH secara signifikan lebih rendah dan konsentrasi aluminium secara signifikan lebih tinggi pada tiga kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol, setelah diberi paparan aluminium klorida ($AlCl_3$). Penelitian lain menunjukkan bahwa, Paparan $AlCl_3$ subkronis merusak struktur ovarium, mengganggu metabolisme zat besi, seng, dan tembaga di ovarium dan menurunkan aktivitas ATPase ovarium serta menurunkan ekspresi reseptor androgenik untuk FSH dan LH yang

menyebabkan infertilitas karena penghambatan ovulasi dan perkembangan korpus luteum (Fu *et al.*, 2014).

2.2.8 Pencegahan Toksisitas Aluminium

Perbaikan stres oksidatif yang diinduksi aluminium dapat dilakukan dengan menyeimbangkan rasio prooksidan dan antioksidan yang rusak. Efek perlindungan yang signifikan terhadap aluminium berasal dari beberapa *chelators*, ekstrak tumbuhan, dan nutrisi antioksidan seperti vitamin, selenium, seng, kurkumin, melatonin dan lain sebagainya (Kumar & Gill, 2014).

Antioksidan adalah zat yang dapat menetralkan ROS dan *Reactive nitrogen species* (RNS) dengan menerima atau mendonasikan elektron (Giorgio, 2015). Molekul antioksidan memiliki peran penting dalam menangkal kerusakan akibat radikal bebas. Vitamin E adalah salah satu antioksidan pemecah rantai yang larut dalam lemak yang diketahui dapat melindungi membran biologis dan lipoprotein dari stres oksidatif. Vitamin E dapat menurunkan kadar aluminium di otak dan meningkatkan kadar CAT dan GSH. Selain vitamin E, vitamin C merupakan antioksidan utama yang memulung ROS dengan cara transfer electron dan menghambat LPO, vitamin C telah terbukti efektif dalam melindungi toksisitas yang diinduksi aluminium pada berbagai jaringan kelinci (Kumar & Gill, 2014).

Melatonin adalah pemulung ROS dan radikal bebas lain yang mencegah reduksi fluiditas membrane yang disebabkan oleh LPO (Kumar & Gill, 2014).

Melatonin merupakan antioksidan kuat yang melindungi organisme dari stres oksidatif (Tan *et al.*, 2015). Efek antioksidan dari melatonin yaitu dapat meningkatkan kadar mRNA enzim antioksidan SOD1, dan CAT pada tikus, serta melatonin juga menunjukkan potensi perlindungannya terhadap stres oksidatif yang diinduksi oleh aluminium (Garcia *et al.*, 2010). Selenium adalah kofaktor GPx yang meningkatkan kadar GSH, merupakan salah satu antioksidan intrinsic

yang melimpah dan mencegah LPO. Serta kerusakan sel yang diakibatkannya.

Selenium terbukti mengembalikan efek merugikan akibat stres oksidatif di hati yang disebabkan oleh paparan aluminium (Viezeliene *et al.*, 2013). Seng adalah mikronutrien penting dalam organisme hidup, memiliki peran dalam replikasi DNA, transkripsi dan sintesis protein, mempengaruhi pembelahan dan diferensiasi sel. Seng telah terbukti dapat mengurangi kerusakan DNA di otak tikus yang disebabkan oleh paparan aluminium kronis (Singla & Dhawan, 2013).

Penggunaan ekstrak tumbuhan dan flavonoid telah diamati memiliki efektivitas yang sama dengan antioksidan dalam menanggulangi paparan aluminium (Kumar & Gill, 2014). Efek antioksidan dari kulit buah delima dapat menurunkan akumulasi aluminium dan merangsang aktivitas antioksidan serta protein anti-apoptosis pada otak tikus yang dipapar aluminium (Moneim, 2012). Daun kelor (*moringa olaifera*) adalah antioksidan kuat yang memiliki efek perbaikan terhadap perubahan enzim antioksidan seperti meningkatkan aktivitas SOD, CAT, *Glutathione-S-transferase* (GST), *glutathione peroksidase*(GPx), *monoamine oksidase* (MAO) dan *asetilkolinesterase* (AChE) dan menurunkan aktivitas *xantin oksidase* (XO), dan *kreatin kinase* (CK) dan tingkat *malondialdehida* (MDA) di otak tikus yang dipapar aluminium (Hegazi & Elebshany, 2019). Ekstrak kunyit juga memiliki efek antioksidan, telah terbukti dapat mengembalikan aktivitas enzim antioksidan dan kadar LPO pada tikus yang dipapar aluminium (Linardaki *et al.*, 2013). Ekstrak kunyit (*Curcuma Longa*) berpengaruh pada kesuburan tikus jantan yang terpapar aluminium klorida (AlCl₃) karena memiliki efek antioksidan dengan menurunkan kadar MDA dan meningkatkan serum testosteron (Boudou *et al.*, 2020).

2.3 Radikal Bebas, ROS dan Stres Oksidatif

2.3.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan adalah elektron yang menempati orbital atom atau molekul sendiri, elektron memerlukan pasangan untuk menyeimbangkan nilai spinnya (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Jumlah elektron ganjil dari radikal bebas membuatnya tidak stabil, berumur pendek dan sangat reaktif. Reaktivitasnya yang tinggi membuat mereka dapat mengabstraksi elektron dari senyawa lain untuk mencapai stabilitas (Phaniendra *et al.*, 2015).

Secara fisiologis ketika sel menggunakan oksigen untuk menghasilkan energi dengan memproduksi *Adenosine triphosphate* (ATP) di mitokondria, maka akan terbentuk radikal bebas. Radikal bebas terbentuk dari molekul melalui pemecahan ikatan kimia sehingga setiap fragmen menyimpan satu elektron dan akan menghasilkan radikal lain melalui reaksi redoks (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Produk sampingan yang dihasilkan adalah ROS dan RNS, kedua produk tersebut memiliki peran ganda sebagai senyawa beracun dan bermanfaat bagi sistem kehidupan. Pada tingkat rendah dan sedang ROS dan RNS memberikan efek menguntungkan pada respon seluler dan fungsi kekebalan (pertahanan terhadap mikroorganisme patogen). Pada konsentrasi tinggi akan menghasilkan stres oksidatif dan stres nitrosatif yaitu suatu proses yang dapat merusak struktur sel.

Sumber radikal bebas berasal dari sumber endogen seperti mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasma, sel fagositik dll, dan dari sumber eksogen seperti polusi, alkohol, asap tembakau, logam berat, logam transisi, pelarut industri, pestisida, obat-obatan tertentu (Phaniendra *et al.*, 2015).

Menurut Kumar *et al.* (2014) Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel melalui tiga cara yaitu:

1. Peroksidasi lipid di membrane

Dengan adanya O_2 radikal bebas dapat menyebabkan peroksidasi lipid di dalam plasma dan membrane. Kerusakan oksidatif dimulai ketika ikatan rangkap dalam asam lemak tak jenuh dari membrane lipid diserang oleh turunan O_2 radikal bebas, terutama oleh $\cdot OH$. Interaksi antara radikal bebas dan lipid menghasilkan peroksida, yang merupakan radikal bebas yang bersifat tidak stabil dan reaktif. Reaksi berantai autokatalik terjadi yang dapat mengakibatkan kerusakan membran.

2. Modifikasi protein teroksidasi

Radikal bebas meningkatkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan protein kovalen *crosss-lins* (misalnya ikatan disulfida), dan oksidasi menggunakan protein. Modifikasi oksidatif protein dapat merusak bagian aktif dari enzim, mengganggu struktur protein, meningkatkan degradasi proteasomal yang dapat meningkatkan kerusakan di seluruh sel.

3. Kerusakan DNA

Radikal bebas mampu menyebabkan putusannya rantai tunggal dan ganda pada DNA. Kerusakan oksidatif DNA dikaitkan dengan penuaan sel dan kerusakan DNA ini mengakibatkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kematian sel.

Radikal bebas bersifat tidak stabil dan umumnya akan terurai secara spontan. Misalnya O_2^- akan terurai secara spontan menjadi O_2 dan H_2O_2 dengan adanya air. Untuk meminimalkan cedera sel akan membentuk mekanisme enzimatik dan non enzimatik. Enzim yang berperan sebagai pembersih radikal bebas dan merupakan enzim antioksidan endogen yaitu katalase, SOD dan *gluthathione peroxide* (Kumar *et al.*, 2014). Ketika terjadi ketidak seimbangan

antara produksi radikal bebas dan pertahanan antioksidan akan menyebabkan stres oksidatif (Phaniendra *et al.*, 2015).

2.3.2 Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS adalah produk sampingan yang dihasilkan dari metabolisme aerobik, dapat berfungsi sebagai molekul pemberi sinyal untuk mengatur proses biologis dan fisiologis (Schieber & Chandel, 2014). ROS diproduksi secara normal dalam sel selama respirasi mitokondria dan pembangkit energi, tetapi setelah itu terdegradasi dan dihilangkan oleh sistem pertahanan seluler. ROS juga diproduksi oleh leukosit yang teraktivasi terutama neutrophil dan makrofag dalam reaksi inflamasi yang bertujuan untuk menghancurkan mikroba dan membersihkan sel-sel mati serta zat yang tidak diinginkan lainnya (Kumar *et al.*, 2014), akan tetapi apabila ROS diproduksi secara berlebihan dan melebihi jumlah antioksidan maka sel akan mengalami stres oksidatif (Poprac *et al.*, 2017). ROS diklasifikasikan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok radikal dan non radikal. Adapun yang termasuk dalam kelompok radikal adalah *superoxide* (O_2^-), *hydroxyl radical* (OH^\cdot), *Alkoxyl radical* (RO^\cdot), dan *peroxyl radicals* (ROO^\cdot). Sedangkan yang tergolong dalam kelompok non radikal adalah hydrogen superoksida (H_2O_2), *singlet oxygen* (1O_2), Ozone (O_3), *organic peroxide* ($ROOH$), *hypochlorous acid* ($HOCl$), dan *hypobromous acid* ($HOBr$) (Phaniendra *et al.*, 2015).

Kelompok radikal adalah spesies yang mengandung paling sedikit satu elektron tidak berpasangan di kulit sekitar inti atom dan mampu hidup secara independen. Oksigen termasuk kelompok radikal, dan karena adanya dua elektron yang tidak berpasangan maka disebut biradikal. Reaktivitas yang tinggi dari kelompok radikal disebabkan oleh adanya satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga mereka akan menyumbangkan elektron atau mendapatkan elektron dari senyawa lain untuk mencapai stabilitas. Sedangkan,

yang termasuk dalam kelompok non radikal, bukanlah radikal bebas tetapi dapat dengan mudah menyebabkan reaksi radikal bebas pada organisme hidup (Phaniendra *et al.*, 2015). Rantai ROS dapat dihentikan dengan reaksi dua ROS secara bersamaan sehingga dua elektron yang tidak berpasangan akan bergabung menjadi berpasangan dan membentuk ikatan kovalen yang stabil (Widayati, 2020).

Tabel 2.2 Beberapa sifat ROS yang menyebabkan kerusakan Sel

No	Properties	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	OH ⁻
1	Mekanisme Produksi	Reduksi O ₂ yang tidak sempurna selama fosforilasi oksidatif; oleh fagosit oksidase dalam leukosit	Dihasilkan oleh SOD dari O ₂ dan oksidase di peroksisom	Dihasilkan dari H ₂ O melalui hidrolisis; dari H ₂ O ₂ melalui reaksi fenton; dan dari O ₂
2	Mekanisme inaktivasi	Konversi ke H ₂ O ₂ dan O ₂ oleh SOD	Perubahan ke H ₂ O dan O ₂ oleh katalase (peroksisom), glutathione peroksidase (di sitosol, mitokondria)	Konversi ke H ₂ O oleh glutathione peroksidase
3	Efek patologis	- Merangsang produksi enzim degradatif dalam leukosit dan sel lain - Dapat secara langsung merusak lipid, protein, DNA	Dapat diubah menjadi OH* dan OCl ⁻ yang dapat menghancurkan sel dan mikroba.	Radikal bebas turunan oksigen yang paling reaktif, komponen dari ROS yang utama untuk merusak lipid, protein dan DNA.

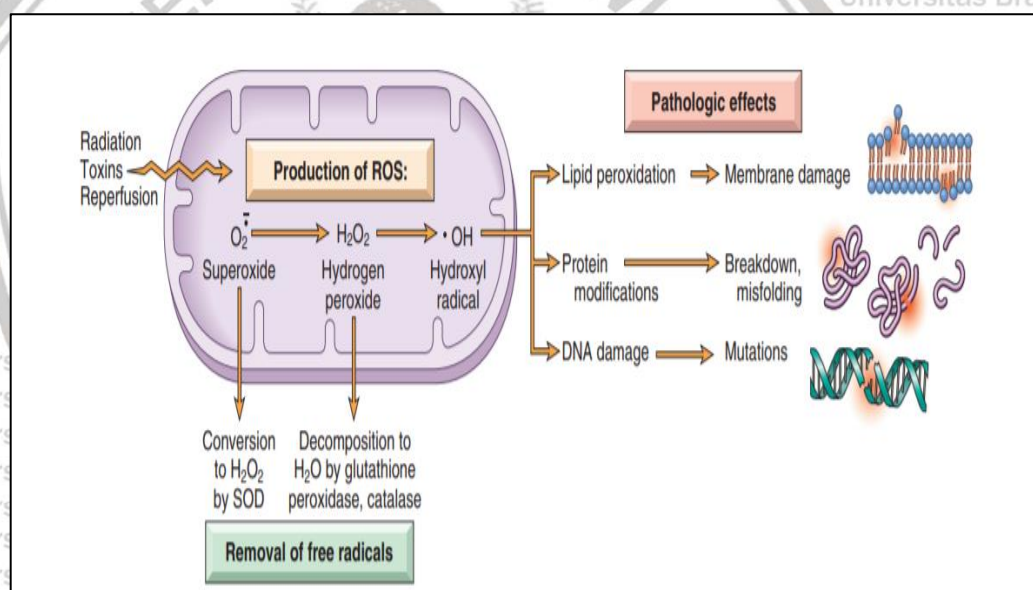
Keterangan : Sifat ROS (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻) yang mengakibatkan kerusakan sel

Sumber : (Kumar *et al.*, 2014)

Di dalam sistem biokimia terdapat keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan, sehingga jaringan tubuh terhindar dari kerusakan akibat ROS. Ketika terjadi peningkatan kadar ROS, tubuh akan merespon dengan memproduksi enzim CAT, GPx, dan SOD untuk menetralkan ROS. Namun akan tetap ada sebagian ROS yang masih tersisa, terutama bila produksi ROS berlebihan. Untuk meredam ROS yang masih tersisa perlu disediakan anti oksidan tambahan seperti vitamin C, vitamin E, asam urat, polyfenol (flavonoid), dan lain-lain untuk

meminimalisir efek ROS tersebut (Widayati, 2020). Produksi ROS yang berlebihan dapat merusak integritas berbagai molekul termasuk lipid, protein dan DNA yang menyebabkan peningkatan stres oksidatif dalam berbagai penyakit (Phaniendra *et al.*, 2015).

Interaksi ROS dengan basa DNA dapat merubah struktur kimia DNA dan apabila tidak direparasi akan mengalami mutasi. Reaksi ROS terhadap lipid tidak jenuh membrane sel dan plasma lipoprotein menyebabkan pembentukan lipid peroksida (*malondialdehyde*) yang secara kimia dapat memodifikasi protein dan asam basa nucleat, ROS juga dapat memodifikasi langsung asam amino dan protein, sehingga tidak lagi dikenal milik sendiri (*self*) tetapi sebagai *nonself* oleh sistem imun (Widayati, 2020).



Gambar 2.5 Peran ROS dalam kerusakan sel

Keterangan : Produksi ROS dapat meningkat oleh banyak rangsangan yang merugikan. Radikal bebas ini dihilangkan dengan kerusakan spontan dan dengan sistem enzimatis khusus. Produksi ROS yang berlebihan atau pembuangan yang tidak memadai menyebabkan akumulasi radikal bebas di dalam sel, yang dapat merusak lipid (dengan peroksidasi), protein dan asam deoksiribonukleat (DNA) yang mengakibatkan kerusakan sel. (Kumar *et al.*, 2014).

2.3.3 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu kondisi dimana terdapat ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan yang dapat mengganggu pensinyalan redoks dan

dapat menyebabkan kerusakan molekuler (Sies, 2020). stres oksidatif terjadi bila ada peningkatan produksi ROS/RNS yang tidak diseimbangkan oleh kapasitas sistem perlindungan endogen yaitu antioksidan untuk melawan radikal bebas tersebut sehingga menyebabkan beberapa kondisi patologi (Pisoschi & Pop, 2015). Stresor di lingkungan seperti sinar UV, radiasi, polutan, logam berat, dan xenobiotic (obat antiblastik) berkontribusi meningkatkan produksi ROS, oleh karena itu menyebabkan ketidak seimbangan dan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif yang merusak sel dan jaringan (Pizzino *et al.*, 2017). Stres oksidatif menyebabkan berbagai macam kondisi patologis seperti kerusakan sel, kanker, penuaan, dan beberapa penyakit degeneratif (Kumar *et al.*, 2014).

Mitokondria dapat mencegah ROS di ruang antar membran dengan tiga mekanisme berbeda, mekanisme pertama melibatkan enzim SOD yang berperan melalui pelepasan O_2 dan menghasilkan hydrogen peroksida (H_2O_2). Ada dua jenis SOD di matriks mitokondria yaitu SOD mengandung situs aktif mangan (MnSOD/SOD2) berperan mengeliminasi O_2^- yang terbentuk di matriks dan SOD yang mengandung tembaga dan seng (*copper-zinc*SOD/SOD1) terletak di sitoplasma sel eukariotik. Mekanisme kedua melibatkan peran sitokrom C di ruang antar membrane untuk mengurangi O_2^- dan meregenerasi oksigen. Selain itu, mitokondria juga memiliki berbagai enzim perbaikan DNA yang dapat memperbaiki kesalahan akibat kerusakan O_2 , karena kromosom mitokondria mengandung 5% dari beberapa protein penting seperti subunit dari nikotinamida adenine dinukleotida dehydrogenase, sitokrom oksidase dan sitokrom b. oleh karena itu, dalam kondisi normal terdapat keseimbangan antara pembentukan ROS dan antioksidan. Ketidakseimbangan yang terjadi pada stres oksidatif diakibatkan oleh peningkatan radikal bebas atau penurunan pertahanan antioksidan (Kumar *et al.*, 2014).

Menurut Kumar *et al.*, (2014) Stres oksidatif dapat menyebabkan beberapa kondisi pada sel atau jaringan, akan tetapi ini tergantung pada tingkat keparahan dan lamanya stres oksidatif itu terjadi. Kondisi tersebut adalah :

1. Beberapa sel akan mengalami peningkatan proliferasi
2. Peningkatan regulasi sistem pertahanan, sebagai adaptasi melawan stres oksidatif. Sistem pertahanan tersebut dapat berupa perlindungan sepenuhnya terhadap kerusakan, perlindungan sampai batas tertentu, dan "over-protect" yang kemudian dapat menyebabkan sel resisten terhadap tingkat stres oksidatif yang lebih tinggi
3. Kerusakan sel. Kerusakan ini melibatkan pada beberapa atau semua target molekuler seperti: lipid, DNA, protein, karbohidrat dan lain-lain.
4. Terjadi *Senescence* yaitu suatu kondisi sel dapat bertahan tetapi tidak dapat membelah lagi.
5. Kematian sel. Setelah mengalami kerusakan, beberapa kemungkinan yang dapat terjadi pada sel adalah, dapat pulih dari kerusakan oksidatif dengan memperbaiki atau mengganti molekul yang rusak, atau dapat bertahan dengan kerusakan oksidatif yang persisten, atau kemungkinan yang lain adalah terjadi kerusakan oksidatif pada DNA yang dapat memicu kematian sel melalui beberapa mekanisme kematian sel seperti apoptosis dan nekrosis.

Beberapa jaringan dan organ tubuh menjadi rentan terhadap stres oksidatif termasuk otak, karena sebagian besar otak terdiri dari lipid yang mudah teroksidasi (Huang *et al.*, 2016). Otak merupakan organ yang meliputi 2% dari berat tubuh manusia, dan memiliki tingkat metabolisme yang tinggi sehingga menyebabkan tingginya konsumsi O_2 yaitu 20% dari total oksigen tubuh.

Ketidaksesuaian antara banyaknya konsumsi oksigen dan berat organ tersebut menghasilkan ketersediaan oksigen yang lebih tinggi yang merupakan prekursor

utama ROS, sehingga hal tersebut membuat otak rentan terhadap stres oksidatif (Patel, 2016). Stres oksidatif juga dapat menyebabkan infertilitas melalui berbagai mekanisme. Produksi ROS yang meningkat akan merusak DNA dari oosit dan spermatozoa yang akan menyebabkan gangguan pada pembuahan. Bahkan, ketika terjadi fertilisasi, stres oksidatif menyebabkan apoptosis yang mengakibatkan fragmentasi embrio, kegagalan implantasi, keuguran, gangguan plasentasi dan kelainan kongenital (Adeoye *et al.*, 2018).

2.4 Antioksidan

Organisme menggunakan sistem antioksidan nonenzimatik dan enzimatik untuk melindungi terhadap ROS dan kerusakan berikutnya pada membran dan makromolekul. Sistem ini bertanggung jawab atas homeostasis dan integritas genom. Sistem non enzimatik terdiri dari banyak sekali molekul antioksidan seperti retinol, asam askorbat, tokoferol, flavonoid, tiol, asam urat, ferritin, bilirubin dan beberapa mikronutrien (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010). Molekul antioksidan secara langsung melawan ROS sehingga mencegah kerusakan oksidatif (Bresciani *et al.*, 2015).

Enzim antioksidan utama adalah superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPx), dan Katalase (CAT). Enzim-enzim ini berperan secara spesifik pada kompartemen dan diatur secara genetic. SOD memecah O_2^- menjadi H_2O_2 untuk menghindari akumulasi ke tingkat toksik. Mekanisme utama untuk menghilangkan H_2O_2 dan peroksida lipid di sitosol dan mitokondria adalah dengan cara dikatalis oleh GPx yang menggunakan glutathione (GSH) untuk mereduksi H_2O_2 dan hiperoksida menjadi air dan alcohol (Bresciani *et al.*, 2015).

CAT adalah salah satu protein peroksisom yang paling melimpah di sel mamalia dan mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Fransen *et al.*, 2012).

2.5 Superoksida Dismutase (SOD)

2.5.1 Definisi SOD

Superoksida dismutase adalah enzim detoksifikasi pertama dan antioksidan endogen paling kuat di dalam sel (Ighodaro & Akinloye, 2018), yang berperan sebagai pertahanan lini pertama untuk melindungi sel dari ROS (Azadmanesh & Borgstahl, 2018). Enzim ini mengkatalis dismutase anion superoksida (O_2^-) menjadi oksigen (O_2) dan hydrogen peroksida (H_2O_2), karena bioaktivitasnya mengais superoksida radikal, SOD dianggap sebagai salah satu metaloenzim antioksidan terpenting (Zhang, Bruins, *et al.*, 2016). Aktivitas SOD dianggap sebagai penanda molekuler untuk mengevaluasi stres oksidatif suatu organisme yang terpapar berbagai kontaminan (Kim *et al.*, 2018).

Superoksida dismutase merupakan metaloenzim sehingga membutuhkan logam sebagai kofaktor untuk aktivitasnya. Ion logam yang biasanya terikat oleh SOD adalah besi (Fe), seng (Zn), tembaga (Cu) dan mangan (Mn). Berdasarkan jenis ion logam yang dibutuhkan sebagai kofaktor oleh SOD, maka SOD diklasifikasikan menjadi tiga bentuk yaitu *iron*-SOD (Fe-SOD), *Manganase*-SOD (Mn-SOD) dan *copper/zinc*-SOD (Cu/Zn-SOD) (Ighodaro & Akinloye, 2018). Berbagai isoenzim SOD dikodekan oleh gen yang berbeda, Cu/Zn-SOD dikode oleh pemetaan gen SOD1 ke kromosom 21. Mn-SOD dikode oleh pemetaan gen SOD2 ke kromosom 6. Cu/Zn-SOD ekstraseluler dikode oleh pemetaan gen SOD3 ke kromosom 4 (Ighodaro & Akinloye, 2018).

2.5.2 Jenis SOD

Beberapa jenis SOD akan dipaparkan sebagai berikut:

1. *Copper/zinc*-SOD (Cu/Zn-SOD)

Cu/Zn-SOD dibagi menjadi dua kelompok yaitu *intraceluler* (icCu/Zn-SOD) dan *extracelluler* (ecCu/Zn-SOD)/SOD3 (Liu *et al.*, 2015). icCu/Zn-SOD merupakan superoksida dismutase (SOD1), adalah molekul bebas karbohidrat

dimerik sitosol termasuk dalam family isoenzim yang berperan sebagai scavenger anion superoksida (Mondola *et al.*, 2016), dan telah terbukti menjadi tipe terpenting dalam kelas SOD karena fungsi fisiologis dan potensi teraupetiknya, disisi lain Cu/Zn-SOD juga merupakan salah satu pemulung radikal bebas yang terpenting dalam melawan stres oksidatif (Liu *et al.*, 2015). SOD1 membutuhkan tembaga dan seng sebagai kofaktor dan terletak di sitosol, nucleus, peroksiom dan ruang antarmembran mitokondria. Isoform penting ini merupakan pertahanan antioksidan dan mutasi dari enzim ini dikaitkan dengan gangguan neurodegenerative seperti amyotrophic lateral sclerosis (Bresciani *et al.*, 2015).

ecCu/Zn-SOD (SOD3) juga membutuhkan tembaga dan seng sebagai kofaktor untuk pemeliharaan aktivitas redoks, isoform ini diproduksi oleh sel otot polos. Karena lokasinya yang ekstraseluler, ecCu/Zn-SOD berperan sebagai pengatur utama NO yang diturunkan dari endotel. ecCu/Zn-SOD berada di pembuluh darah jantung, paru-paru, kandung kemih, dan cairan ekstraseluler, maka dari itu ecCu/Zn-SOD memainkan peran penting dalam gangguan neurologis dan kardiovaskuler (Bresciani *et al.*, 2015).

2.1.2. Manganase-SOD (Mn-SOD)/SOD2

Manganase-SOD (Mn-SOD)/SOD2 berperan penting dalam sejumlah sistem fisiologis, peningkatan regulasi Mn-SOD terbukti mengurangi apoptosis di otak, kardiopati diabetic, dan memulihkan keseimbangan redoks di otot rangka setelah *exercise*. Induksi Mn-SOD dapat melindungi dari gangguan neurotoksik, kardiomiopati dan gangguan disbetes (Bresciani *et al.*, 2015). Mn-SOD merupakan protein precursor yang diproduksi di mitokondria dan memiliki peran penting dalam sitoplasma setelah pembelahan sinyal peptida (Liu *et al.*, 2015). Mn-SOD ditemukan di prokariota dan di mitokondria eukariota (Kim *et al.*, 2018).

3. Iron-SOD (Fe-SOD)

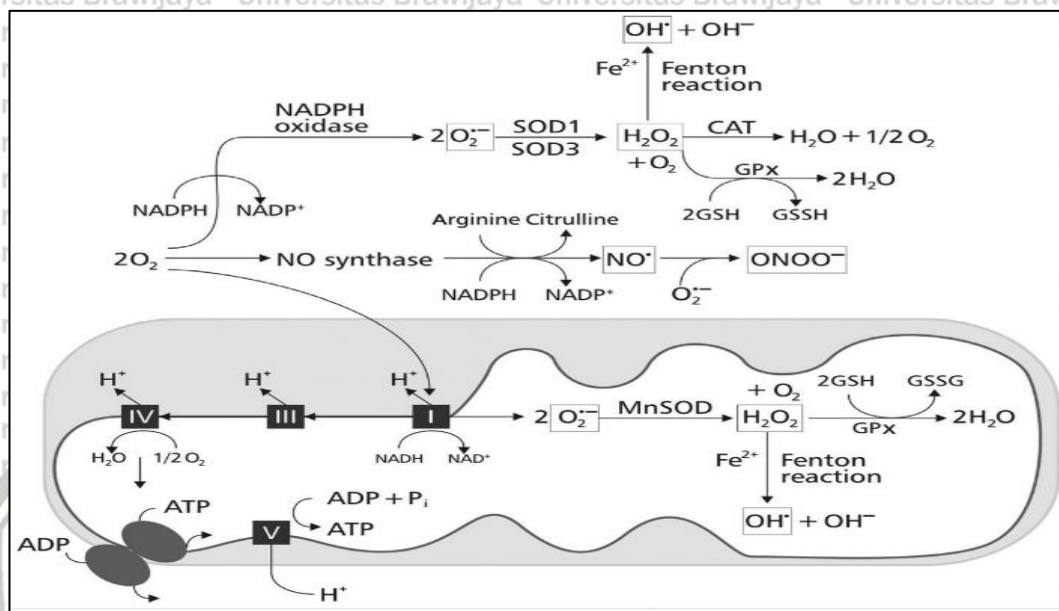
Fe-SOD hanya terdapat pada prokariotik, tumbuhan dan protozoa (Kim *et al.*, 2018). Fe-SOD memiliki bagian aktif yang hamper sama dengan Mn-SOD. Kofaktor mangan atau besi dikoordinasikan menjadi tiga histidin, satu aspartate dan satu molekul pelarut dalam geometri bipiramidal trigonal yang terdistorsi. Di luar situs aktif, keseluruhan urutan primer dan lipatan tersier Mn- dan Fe-SOD sangat mirip (Bresciani *et al.*, 2015).

2.5.3 Peran SOD terhadap Radikal Bebas

Superoksida dismutase berperan mengkatalis pelepasan dua molekul anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sehingga mengurangi potensi untuk berbahaya. SOD merupakan antioksidan yang bertindak menekan atau mencegah pembentukan radikal bebas atau ROS dalam sel, merupakan sistem pertahanan lini pertama tubuh terhadap stres oksidatif (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Anion superoksida (O_2^-) yang terus menerus dihasilkan melalui proses endogen dan sumber eksogen melalui beberapa jalur yang berbeda menyebabkan pembentukan beberapa spesies reaktif lainnya (Ighodaro & Akinloye, 2018). NADH mengumpulkan elektron dari molekul oksigen. Elektron kemudian mengalir melalui kompleks rantai transport elektron mitokondria (ETC) untuk resintesis ATP. Terdapat beberapa molekul oksigen yang mengalami reduksi tidak sempurna sehingga menimbulkan superoksida (O_2^-), yang merupakan salah satu jenis ROS. Mn-SOD berperan memutus O_2^- menjadi H_2O_2 dan O_2 , selanjutnya H_2O_2 dinetralkan oleh *glutathione peroksidase* (GPx) menjadi H_2O dengan *glutathione* (GSH) sebagai substrat. H_2O_2 juga dapat diubah menjadi radikal hidroksil berbahaya (OH^\cdot) melalui reaksi fenton dengan besi (Fe^{2+}). Diluar mitokondria O_2^- juga dapat diubah menjadi O_2^\cdot melalui reaksi *NADPH-oksidadase* dengan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

(NADPH) sebagai substrat. Selanjutnya Cu/Zn-SOD memutus O_2^- di ruang antar membran, sedangkan reaksi yang sama juga terjadi di lingkungan ekstraseluler yang dilakukan oleh ecCu/Zn-SOD, mekanisme ini terlihat pada gambar 2.6 dibawah ini (Bresciani *et al.*, 2015).



Gambar 2.6 Pembentukan ROS dan Pertahanan SOD

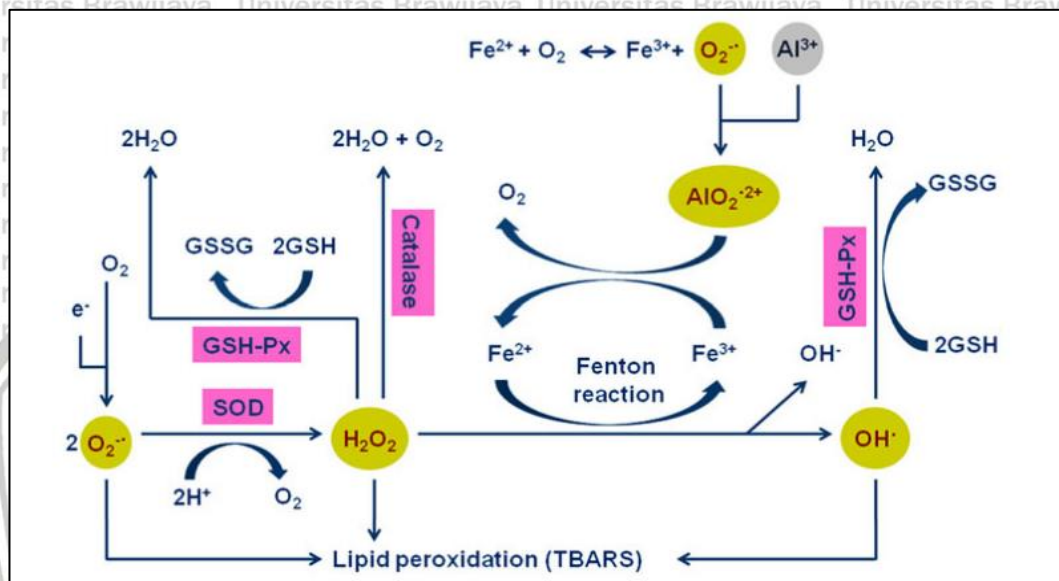
Keterangan : Sumber : (Bresciani *et al.*, 2015)

Nitrit oksida (NO) adalah molekul yang diproduksi dalam konsentrasi tinggi untuk bersaing dengan superoksida dismutase (SOD) dalam berikatan dengan O_2^- (Ahmad *et al.*, 2019). Superoksida dapat langsung bereaksi dengan NO membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$). Reaksi antara NO dan O_2^- berlangsung tiga kali lebih cepat dibandingkan dengan penguraian O_2^- oleh SOD (Wang *et al.*, 2018). Peroksinitrit ($ONOO^-$) yang dihasilkan dari reaksi antara O_2^- dan NO dapat menghambat SOD (Ahmad *et al.*, 2019).

2.5.4 SOD dan Stres Oksidatif di Otak yang Diinduksi Aluminium

Efek toksik aluminium timbul karena adanya aktivitas prooksidan yang menghasilkan stres oksidatif, serangan radikal bebas serta oksidasi protein seluler dan lipid (Igbokwe *et al.*, 2019). Ion aluminium dapat mengubah sifat dan struktur membrane sel, sedangkan membrane sel merupakan bagian penting

untuk kelangsungan hidup sebuah sel, dan paparan aluminium dapat mengganggu aktifitas membrane sel melalui stres oksidatif. Aluminium juga menghasilkan ROS yang mengakibatkan kerusakan oksidatif lipid, protein dan DNA (Osama *et al.*, 2014). Fosfolipid membran sel otak yang bermuatan negatif mengandung asam lemak tak jenuh ganda, sangat mudah diserang oleh ROS (Yuan *et al.*, 2012).



Gambar 2.7 Hubungan antara aluminium, spesies oksigen reaktif (ROS), enzim antioksidan dan Peroksidasi lipid

Keterangan : Aluminium terlibat dalam reaksi fenton di otak. Dalam reaksi tersebut, Al^{3+} (berwarna abu-abu), Fe^{2+} , dan elektron yang tidak berpasangan memediasi produksi ROS seperti $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , dan $AlO_2^{\cdot-2+}$ (berwarna kuning). SOD berperan dalam menguraikan $O_2^{\cdot-}$, Catalase berperan dalam menguraikan H_2O_2 dan Gpx menguraikan OH^{\cdot} (enzim antioksidan berwarna merah muda). Sumber (Yuan *et al.*, 2012).

Paparan aluminium dapat mempercepat peroksidasi lipid (LPO) yang dimediasi besi dan mengakibatkan kerusakan oksidatif dengan meningkatkan konsentrasi zat besi aktif di otak. Peningkatan radikal bebas dan hilangnya homeostasis seluler menyebabkan stres oksidatif (Amjad & Umesalma, 2015). Aluminium mengubah keadaan redoks seluler dengan menghambat enzim yang terlibat dalam pertahanan antioksidan yang berfungsi sebagai penghambat radikal bebas, sehingga akan terjadi penurunan yang signifikan terhadap aktivitas SOD di beberapa bagian otak. Aluminium dapat mengikat fosfolipid otak yang

bermuatan negatif, yang mengandung asam lemak tak jenuh ganda dan mudah diserang oleh ROS seperti O_2^- , H_2O_2 , dan OH^\cdot . Aluminium merangsang peroksidasi lipid yang dipicu oleh zat besi dalam reaksi fenton, yang menyebabkan produksi ROS dan pembentukan Fe^{3+} . Produk oksidatif yang dilepaskan seperti malondialdehida, karbonil, proksinitril, dan nitrotirosin. Ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan ditandai dengan peningkatan LPO dan penurunan kadar enzim antioksidan (Maya *et al.*, 2016).

Amjad & Umesalma (2015) melaporkan bahwa paparan aluminium klorida memicu peroksidasi lipid (LPO), dan secara signifikan menurunkan kadar SOD, CAT, GSH dan glutathione-S-transferase (GST) di beberapa bagian otak tikus yaitu korteks serebral, striatum, hipotalamus dan hipokampus. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nehru & Bhalla (2006) yaitu terjadi penurunan yang signifikan aktifitas SOD di empat bagian otak yaitu otak besar, otak kecil, hipotalamus dan medulla oblongata pada tikus betina *Sprague dawley* setelah dipapar aluminium klorida. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan aktivitas enzim antioksidan yaitu SOD, CAT dan GSH pada otak tikus yang dipapar $AlCl_3$ dengan dosis 45 mg/kg selama 45 hari (Shati *et al.*, 2011).

2.6 Follicle Stimulating Hormone (FSH)

2.6.1 Definisi FSH

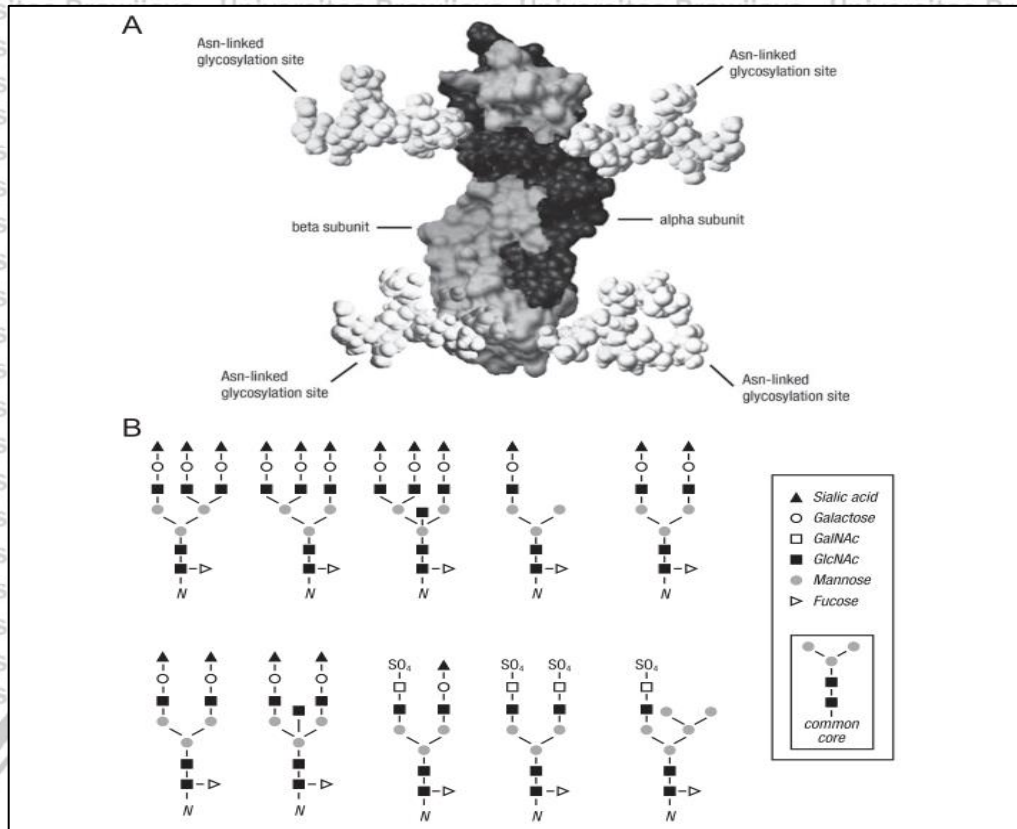
Follicle Stimulating Hormone (FSH) adalah bagian dari hormon gonadotropin hipofisis yang berperan penting dalam sistem reproduksi. Pada wanita, FSH berfungsi menstimulasi pembentukan antrum di folikel skunder, merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel antral serta mempersiapkan folikel antral untuk ovulasi sebagai respon terhadap lonjakan LH (Bousfield & Harvey, 2019). FSH disekresikan oleh sel gonadotrop dari hipofisis yang

sekresinya diatur oleh stimulasi pulsatile *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) (Casarini & Crepieux, 2019). FSH adalah hormone glikoprotein heterodimerik yang terdiri dari dua sub unit berbeda yaitu subunit- α dan subunit- β , subunit- α umum untuk semua hormon glikoprotein hipofisis dan plasenta sedangkan subunit- β secara khusus mengikat *G protein-coupled receptor* (GPCR) nya yaitu FSHR (Das & Kumar, 2018; Casarini & Crepieux, 2019).

2.6.2 Struktur Biologi FSH

Struktur FSH adalah heterogen glikoprotein yang terdiri dari 2 rantai protein terpisah, rantai alfa dan beta. Urutan 92 asam amino (AA) rantai alfa identic untuk 3 gonadotropin (FSH, LH dan hCG), sedangkan rantai beta khusus untuk setiap gonadotropin dan dapat memberikan perilaku biologis yang spesifik dan memungkinkan fungsi berbeda dari setiap hormon (Leao & Esteves, 2014). Subunit α terdiri dari 92 asam amino, sedangkan subunit β FSH terdiri dari 118 asam amino dan 5 residu asam sialat. Residu asam sialat ini bertanggung jawab atas waktu paruh hormon, dimana semakin tinggi kandungan asam sialat, semakin lama waktu paruh molekul tersebut (Beshay & Carr, 2017).

Follicle Stimulating Hormone memiliki struktur yang heterogen, terdapat perbedaan bagian karbohidrat yang ditambahkan selama biosintesis glikoprotein. FSH memiliki struktur oligosakarida yang terkait asparagine (Asn) yang menunjukkan derajat kompleksitas structural dan komposisi kimia yang berbeda. FSH memiliki 4 situs glikosilasi yang terhubung dengan Asn, 2 pada setiap subunit. Penambahan struktur oligosakarida ke situs-situs ini adalah hasil modifikasi setelah translasi yang dimulai di retikulum endoplasma kasar dan diselesaikan di Golgi. Oligosakarida ini memiliki struktur inti yang sama yang mencakup 3 residu manosa dan 2 residu N-asetilglukosamin (Smitz *et al.*, 2015).



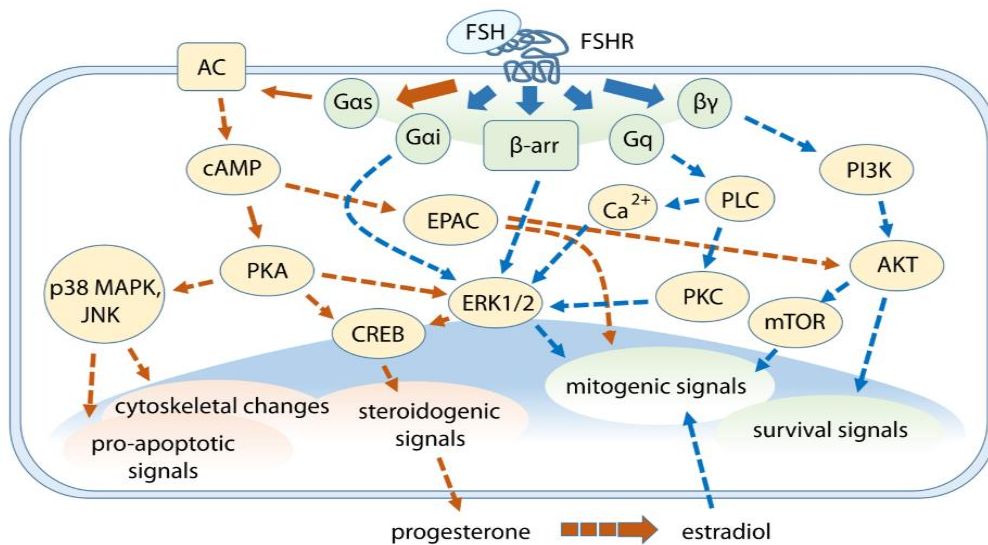
Gambar 2.8 Struktur Biologi Follicle Stimulating Hormone (FSH)

Keterangan : A, Struktur FSH manusia. B, Contoh struktur oligosakarida terkait Asn yang ditemukan di FSH manusia dan hewan. Asn (asparagine); FSH (*Follicle Stimulating Hormone*); GalNAc (*N-acetylgalactosamine*); GlcNAc (*N-acetylglucosamine*). (Smitz *et al.*, 2015)

2.6.3 Mekanisme Kerja FSH

Follicle Stimulating Hormone memediasi beberapa jalur pensinyalan dan melakukan aksi biologisnya dengan mengikat G reseptor, reseptor FSH (FSHR) (Lizneva *et al.*, 2019). Protein Gas stimulatori adalah transduser FSH yang berperan meningkatkan cAMP intraseluler dan aktivasi protein kinase A (PKA), serta bertindak sebagai pengatur utama metabolisme sel dan produksi steroid seks. Aktivitas PKA memediasi gametogenesis dengan memicu sinyal proliferasi pada *in vivo*. Sedangkan beberapa data *in vitro* menunjukkan bahwa terdapat jalur pro-apoptosis dari steroidogenesis yang bergantung pada cAMP/PKA, yang mungkin diperlukan untuk mengatur atresia folikel ovarium non dominan (Casarini & Crepieux, 2019).

Rangkaian peristiwa tersebut diatas mengarah pada aktivasi *cAMP* regulator elemen binding protein (CREB). selain CREB, PKA yang diaktivasi *cAMP* mengaktifkan beberapa faktor lain seperti p38 MAP kinase (MAPK) yang merupaka pengatur sinyal kematian dalam sel steroidogenik dan melibatkan p53 serta kaspase, p70-S6 kinase, *phosphoinositide-3 kinase* (PI3K), PKB / Akt dan FOXO1 dan mengatur ekspresi gen dalam jaringan target. Aktivasi FSHR juga berpengaruh terhadap G α i, G α q, dan β -arrestin. Dalam hal ini, transduksi sinyal dilakukan melalui inositol trisphosphate (IP3), Akt dan ERK1 / 2. (Lizneva *et al.*, 2019). Estrogen merupakan produk akhir yang dibutuhkan untuk perkembangan folikel dominan, dengan mengorbankan beberapa folikel lain yang menjadi atresia. Diketahui bahwa atresia folikuler disebabkan oleh penurunan FSH dan adanya sinyal pro-apoptosis (Casarini & Crepieux, 2019).



Gambar 2.9 Cross-talk antara sinyal steroidogenik bergantung pada FSH

Keterangan: Subunit protein G dan β -arrestin memediasi aktivasi jalur pensinyalan berganda yang memodulasi kejadian yang berbeda. Gas protein/ *cAMP*-related signaling diwakili oleh panah oranye sedangkan cascade pensinyalan bergantung pada interaktor intraseluler FSHR lainnya yang ditunjukkan dengan panah biru. Peristiwa steroidogenik terutama dimediasi melalui jalur *cAMP*/PKA, yang terkait dengan pensinyalan p38 MAPK, sedangkan ERK1/2 dan AKT adalah berperan untuk aktivasi sinyal mitogenik dan kelangsungan hidup. (Casarini & Crepieux, 2019)

Pada akhir fase luteal, konsentrasi FSH meningkat, dan FSH mendorong perekrutan dan pertumbuhan folikel antral awal melalui interaksinya dengan reseptor berpasangan G-protein pada sel granulosa. FSH mendorong proliferasi dan pematangan sel granulosa dan saat sel-sel ini berkembang sebagai respon terhadap FSH, jumlah reseptor FSH meningkat secara bersamaan. Selama fase midfolikuler konsentrasi FSH meurun, menyebabkan perkembangan selektif dari folikel yang matang yang mengandung granulosa dengan kepekaan yang meningkat terhadap FSH. FSH juga mendorong perkembangan reseptor LH dalam sel granulosa, ini merupakan tahap persiapan folikel yang matang untuk ovulasi. Dengan demikian, sel-sel folikel yang matang merespons stimulasi dari FSH dan LH (Smits *et al.*, 2015).

2.6.4 Peran FSH dalam Reproduksi

Follicle Stimulating Hormone (FSH) berperan dalam jaringan gonad, terutama pada sel sertoli pada testis dan sel granulosa di ovarium. Di ovarium, FSH mengatur folikulogenesis, pemilihan oosit, dan sintesis hormone steroid seks, sehingga mempersiapkan sistem reproduksi untuk pembuahan, implantasi dan kehamilan (Casarini & Crepieux, 2019). FSH adalah gonadotropin yang disintesis di gonadotrop kelenjar hipofisis anterior (McDonald *et al.*, 2019). Sintesis dan pelepasan FSH diatur oleh beberapa protein hipofisis seperti folistatin dan aktivin, sedangkan inhibin B dan estradiol adalah penghambat utama sekresi FSH (Lizneva *et al.*, 2019). FSH dan LH berada di bawah regulasi GnRH, dan mengatur fungsi gonad pada pria dan wanita dengan mengaktifkan reseptornya (Desai *et al.*, 2013). FSH mulai meningkat beberapa hari sebelum menstruasi dan berperan atas perekrutan folikel ovarium serta pemilihan folikel dominan (Beshay & Carr, 2017).

Defisiensi FSH pada manusia menyebabkan gangguan perkembangan pubertas pada wanita dan azoospermia pada pria, serta menyebabkan infertilitas

baik pada wanita maupun pria. Tikus betina yang kekurangan FSH mengalami blok pada folikulogenesis sebelum stadium antral yang mengakibatkan kemandulan, sedangkan pada tikus jantan akan mengalami gangguan fungsi reproduksinya karena jumlah sperma yang lebih rendah dan mengakibatkan tidak subur. Fungsi fisiologis normal FSH pada wanita yaitu, FSH yang rendah dapat menghambat pertumbuhan folikel, sedangkan kadar FSH yang terlalu tinggi dikaitkan dengan *premature ovarian failure* (POF). Tikus betina yang memiliki kadar FSH terlalu tinggi atau berlebih menyebabkan infertilitas, karena faktanya peningkatan kadar FSH dalam sirkulasi disebabkan oleh pengiriman kembali FSH ke jalur sekretori yang diatur GnRH. Peningkatan FSH yang berlebih juga terlihat pada wanita menopause (Coss, 2020).

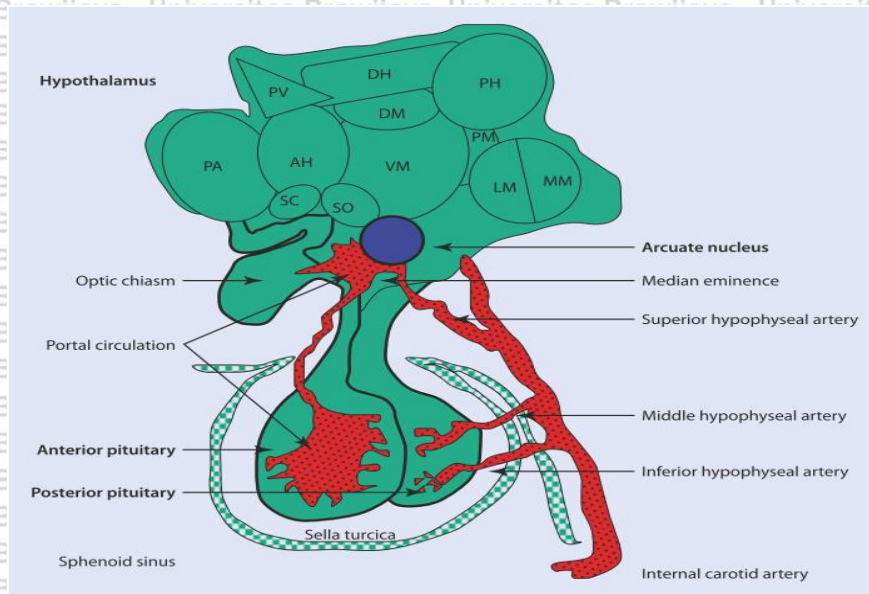
2.7 Hypothalamic-Pituitary-Ovary (HPO) Axis

Pengaturan sistem reproduksi wanita terdiri dari interaksi kompleks antara umpan balik endokrin dari hipotalamus, hipofisis dan ovarium, ketiga kelenjar neuroendokrin tersebut harus bekerjasama untuk meamastikan berfungsinya sistem reproduksi dengan baik (Davis & Hackney, 2017). Hubungan antara sumbu pusat (hipotalamus dan adenohipofisis) dengan gonad (ovarium) atau dikenal dengan sumbu HPO sebagai pengatur utama sistem reproduksi wanita, dan dikenali sebagai gambaran dari kontrol umpan balik gonadotropin oleh sekresi ovarium (Naftolin *et al.*, 2019).

Hipotalamus hanya 0,3% dari keseluruhan total otak, meskipun ukurannya kecil, hipotalamus mengandung banyak nucleus yang berperan untuk regulasi endokrin, reproduksi, metabolisme, pengaturan suhu, respon emosional dan keseimbangan elektroit. Hipotalamus terdiri dari tiga zona yaitu lateral, medial dan preventrikuler. Di dalam setiap zona tersebut terdapat beberapa nukleus, dimana salah satu intinya yaitu inti arkuta berhubungan dengan reproduksi yang berperan memproduksi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH)

(Beshay & Carr, 2017). Proses pensinyalan dimulai di hipotalamus, dimana *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) dilepaskan ke aliran darah dan masuk ke kelenjar pituitary. GnRH adalah hormon peptida yang disekresikan oleh neuron hipotalamus dan akan berikatan dengan reseptor GnRH di gonadotrof kelenjar pituitari (Naftolin *et al.*, 2019). Pelepasan pulsatile GnRH dari hipotalamus merangsang pelepasan FSH dan *Luteinizing hormone* (LH) (Lizneva *et al.*, 2019). GnRH dilepaskan secara perlahan untuk menghasilkan pulsatile dan variasi frekuensi pelepasan GnRH memiliki efek yang berbeda pada sintesis dan pelepasan gonadotropin. FSH distimulasi pada frekuensi *pulse* GnRH rendah, sedangkan LH distimulasi pada frekuensi *pulse* GnRH tinggi (Stamatiades *et al.*, 2019).

Kelenjar pituitari dikenal sebagai kelenjar utama endokrin, terletak di bawah ventrikel ketiga dan di atas sinus sphenoidal dalam rongga tulang yang disebut sella turcica. Terdapat dua bagian utama kelenjar hipofisis yaitu adenohipofisis dan neurohipofisis. Kelenjar pituitari juga dibagi menjadi dua lobus utama yaitu lobus anterior dan posterior. Hipofisis anterior berisi beberapa jenis sel yaitu: gonadotrop (berperan untuk sekresi FSH dan LH), tiotrop (bertanggung jawab untuk sekresi *thyroid-stimulating hormone* (TSH)), somatomammotrop (berperan untuk sekresi GH), dan laktotrop (bertanggung jawab untuk sekresi prolaktin). Selain hormon tersebut, hipofisis anterior mengeluarkan aktivin, inhibin, dan follistatin, yang berperan dalam mengatur siklus menstruasi. Lobus hipofisis posterior mengandung dua jenis sel yang mengeluarkan ADH (hormon antidiuretik) dan oksitosin (Beshay & Carr, 2017). GnRH diangkut dari hipotalamus melalui sistem portal hipofisis ke hipofisis anterior dimana terdapat reseptornya (GnRHR) (Blair *et al.*, 2015). Gonadotrof hipofisis mengekspresikan reseptor GnRH di permukaan sel yang mengatur produksi dan sekresi hormon FSH dan LH (Naftolin *et al.*, 2019).



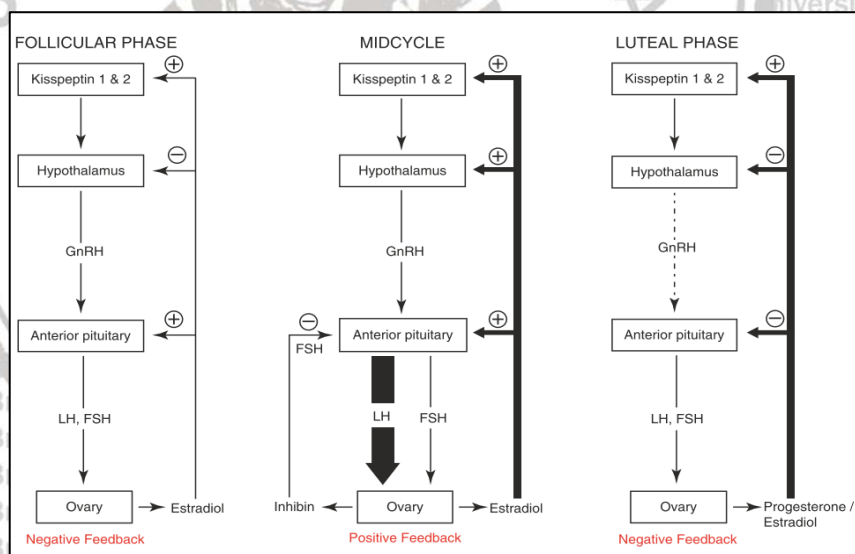
Gambar 2.10 Ilustrasi Hipotalamus dan Hipofisis

Keterangan : Salah satu nucleus yang terdapat pada hipotalamus yaitu nucleus arkuata merupakan situs utama neuron penghasil GnRH. GnRH dilepaskan dari median eminence ke dalam sistem portal. Aliran darah ke kelenjar pituitary berasal dari arteri karotis interna. Selain nucleus arkuata, inti hipotalamus lainnya adalah inti supraoptik (SO), inti suprachiasmatic (SC), inti paraventrikular (PV);inti dorsalmedial (DM), inti ventromedial VM, inti hipotalamus posterior (PH), inti premammillary (PM), nukleus mammillary lateral (LM), nukleus mammillary medial (MM). Sumber : (Beshay & Carr, 2017)

Gonad pada wanita terdiri dari ovarium bilateral (Beshay & Carr, 2017).

FSH dan LH yang dihasilkan dari hipofisis anterior akan berikatan dengan reseptor di ovarium, yang akan berperan dalam proliferasi dan perkembangan folikel ovarium, ovulasi serta perkembangan dan fungsi korpus luteum (Naftolin *et al.*, 2019). FSH menginduksi pertumbuhan sel granulosa dan mengaktifkan aktivitas aromatase yang mengubah androgen menjadi estrogen (Beshay & Carr, 2017). Fase folikuler ditandai dengan peningkatan sekresi estradiol yang terus menerus (Beshay & Carr, 2017). Estrogen yang bersirkulasi menginduksi GnRH pada permukaan gonadotrop membuat mereka lebih peka terhadap GnRH, namun secara bersamaan estradiol yang bersirkulasi juga menurunkan sekresi GnRH (Naftolin *et al.*, 2019). Kadar FSH kemudian mulai menurun karena produksi estrogen dan inhibin B oleh sel-sel granulosa, inhibin secara selektif menghambat sekresi FSH dari hipofisis anterior sehingga menciptakan umpan

balik negatif (Beshay & Carr, 2017). Segera sebelum ovulasi, LH melonjak (surge) sebagai respon terhadap produksi estradiol oleh folikel dominan dalam mode umpan balik positif kemudian akan terjadi ovulasi. Kadar LH kemudian menurun pada fase sekresi di siklus tersebut (Blair *et al.*, 2015). Pelepasan lonjakan GnRH dipicu oleh umpan balik positif loop yang melibatkan peningkatan cepat konsentrasi estradiol plasma. Pada tikus dan manusia, baik estradiol maupun progesteron berperan dalam merangsang lonjakan LH. Pada tahap awal siklus estrus, kadar estradiol rendah dan pelepasan GnRH terhambat. Saat level estradiol melonjak pada siklus proestrus, GnRH dilepaskan dan menyebabkan pelepasan LH, yang merangsang produksi progesteron di ovarium. Pelepasan GnRH ini tidak secara langsung melalui aksi estradiol pada sel GnRH, melainkan melalui sel perantara yang mengandung kisspeptin neuropeptida (Christensen *et al.*, 2012).



Gambar 2.11 Hypothalamic-Pituitary-Ovary (HPO) axis

Keterangan : Gonadotropin disekresikan oleh gonadotrof di kelenjar hipofisis anterior. Ukuran dan frekuensi *pulses* diatur oleh sekresi peptida hipotalamus GnRH. Umpan balik negatif disebabkan oleh estradiol yang disekresikan oleh folikel ovarium yang sedang berkembang. Pada periode postovulatory kombinasi estradiol dan progesterone yang disekresikan oleh korpus luteum akan menekan GnRH untuk mencapai tingkat gonadotropin terendah dalam siklus. Pada umpan balik positif, disaat sekresi estrogen maksimal, sekresi GnRH meningkat dan menyebabkan lonjakan LH (*LH-surge*), yang akan menyebabkan ovulasi. Sumber: (Naftolin *et al.*, 2019)

2.8 Kunyit (*Curcuma longa*)

2.8.1 Definisi Kunyit

Rimpang kunyit (*curcuma longa*) adalah tanaman herbal yang termasuk anggota keluarga jahe (*Zingiberaceae*) (Omosa *et al.*, 2017). Kunyit merupakan salah satu jenis tanaman obat yang banyak tumbuh di wilayah Asia. Selain digunakan sebagai tanaman obat, kunyit juga digunakan sebagai bumbu pada masakan dan berpengaruh pada sifat, warna dan rasa. Kunyit digolongkan dalam tanaman obat atau memiliki efek terhadap kesehatan karena salah satu kandungannya adalah kurkumin atau sering disebut dengan *diferuloylmethane*, merupakan senyawa polifenol alami yang memiliki manfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, antimikroba, dan antikanker (Hewlings & Kalman, 2017; Kocaadam & Sanlier, 2017).

2.8.2 Taksonomi dan Morfologi Kunyit

Curcuma longa tumbuh hingga sekitar 120 cm tetapi terdapat variasi yang signifikan terhadap tinggi tanaman disebabkan oleh varietas maupun kondisi agroklimat yang berbeda (Nair, 2019), daunnya sangat besar dan panjangnya mencapai 1,2m atau lebih, bunganya berwarna kuning yang panjangnya 10-15 cm, tumbuh secara berkelompok yang muncul diakhir musim semi. Rimpangnya berwarna coklat kekuningan dengan bagian dalamnya berwarna jingga yang tampak kuning cerah saat menjadi bubuk, rimpangnya memiliki panjang 2,5-7,0 cm dan diameter 2,5 cm dengan umbi kecil yang bercabang. Tidak diketahui secara pasti darimana kunyit berasal, akan tetapi dipekirakan berasal dari daerah tropis seperti asia tenggara dan kemungkinan besar dari India. Berikut taksonomi tumbuhan kunyit (Sirisidthi *et al.*, 2016) :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi : Spermatophyta

Divisio : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub-kelas : Zingiberidae

Ordo : Zingiberales

Family : Zingiberaceae

Genus : Curcuma

Spesies : *Curcuma longa* L.



Gambar 2.12 Rimpang Kunyit

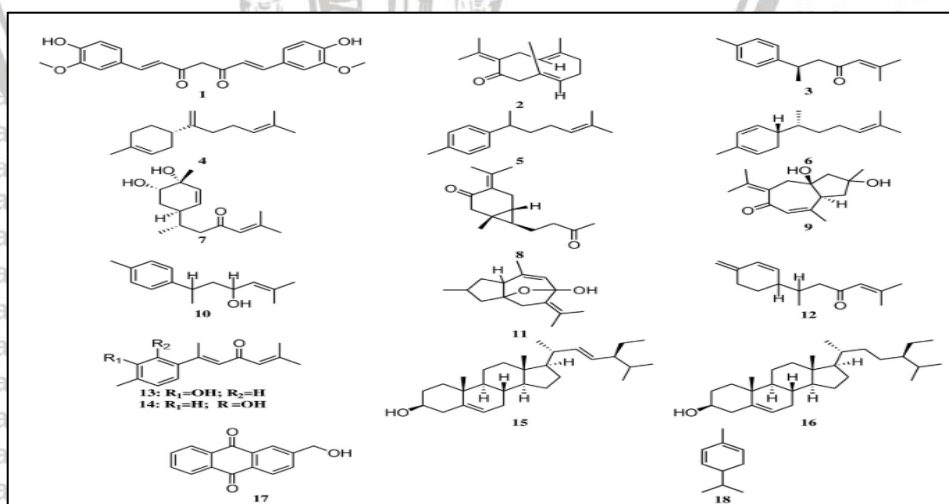
Keterangan : Sumber : (Sharif *et al.*, 2019)

2.8.3 Kandungan Senyawa Kimia di dalam Kunyit

Warna kuning yang terdapat pada rimpang kunyit disebabkan oleh adanya kurkuminoid seperti kurkumin dan turunannya yaitu *demethoxycurcumin*, *bis-demethoxycurcumin*, *demthoxycurcumin*, *5'-methoxycurcumin*, *dihydrocurcumin*, dan *cyclocurcumin*. Kandungan senyawa lain yang terdapat di rimpang kunyit adalah germacrone, α -turmerone, β -bisabolene, α -curcumene, zingiberene, β -sesquiphellandene, bisacurone, curcumenone, dehydrocurdinone, procurcumadiol, bisacumol, curcumenol, isoprocurcumenol, epiprocurcumenol, zedoaronediol, curlone, turmeronols A dan B. Terdapat juga senyawa Steroid,

seperti stigmasterol, β -sitosterol, kolesterol dan antrakuinon. Rimpang kunyit mengandung minyak atsiri yang terdiri dari 6 senyawa yaitu, α - phellandrene, sabinene, cineol, borneol, dan seskuitepen. (Omosa *et al.*, 2017).

Kunyit kering mengandung 69,43% karbohidrat, 6,3% protein, 5,1% minyak, 3,5% mineral, dan unsur lainnya. Kandungan kimia bioaktif dalam kunyit telah diteliti secara ekstensif. Sampai saat ini, sekitar 235 senyawa, terutama fenolat dan terpenoid telah diidentifikasi dari berbagai spesies kunyit (Tanvir *et al.*, 2017). Sari akar kunyit yang ditumbuk dan dikeringkan mengandung kurkumoid yang terdiri dari kurkumin (77%), demethoxycurcumin (17%), dan bidehydroxycurcumin (Kocaadam & Sanlier, 2017). Komposisi gizi dalam 100g kunyit adalah 50mg asam askorbat, 6,8g abu, 0,2g kalsium, 69,9g karbohidrat, 8,9g lemak, 390Kkal energi pangan, 47,5g zat besi, 4,8mg niacin, 260mg fosfor, 200mg kalium, 8,5g protein, 0,19 mg riboflavin, 30 mg natrium, 0,09 mg tiamin, dan 6,0 g air (Sirisidthi *et al.*, 2016) Kondisi geografis wilayah dan jenis tanah tempat tumbuh kunyit dapat mempengaruhi pertumbuhan, komposisi nutrisi dan kualitas tanaman (Kocaadam & Sanlier, 2017).



Gambar 2.13 Struktur Kimia beberapa Senyawa dari Curcuma longa

Keterangan : Curcumin (1); germacrone (2); ar-turmerone (3); β -bisabolene (4); α -curcumene (5); zingiberene (6); bisacurone (7); curcumenone (8); procurcumadiol (9); bisacumol (10); curcumenol (11); curlone (12); turmeronols A (13) and B (14); stigmasterol (15); β -sitosterol (16); 2-hydroxymethyl anthraquinone (17); α -phellandrene (18).

2.8.4 Farmakokinetik dan Farmakodinamik Kurkumin

Pada manusia kurkumin aman dikonsumsi pada dosis yang besar yaitu 12 g/hari tetapi memiliki bioavailabilitas yang kurang baik, karena absorpsi yang kurang, metabolisme yang cepat dan eliminasi sistemik yang cepat. Kurkumin akan dimetabolisme melalui proses konjugasi, hasil dari metabolit kurkumin berupa *tetrahydrocurcumin*, *glucuronide* dan *hexahydrocurcumin*, ditemukan dalam mikrosom usus, hati, dan sitosol. Kurkumin dapat berikatan dengan albumin serum, ditransport dengan cepat dalam sel dan jaringan (Martha *et al.*, 2016). Pemberian kurkumin secara intravena menyebabkan kurkumin terdeposisi di hati, limpa, paru-paru dan otak sehingga dapat disimpulkan bahwa kurkumin memiliki afinitas spesifik untuk beberapa jaringan tubuh. Ekskresi metabolit kurkumin tergantung pada rute pemberian yang digunakan, untuk pemberian oral, 75% metabolit kurkumin ditemukan hanya dalam tinja tetapi tidak dalam urin. Namun, ketika kurkumin diberikan secara intraperitoneal, 73% dari metabolit ini ditemukan dalam tinja dan sekitar 11% dalam urin (Zahra *et al.*, 2020).

2.8.5 Peran Kunyit sebagai antioksidan

Salah satu kandungan kunyit adalah kurkumin, merupakan polifenol yang telah terbukti memiliki banyak manfaat untuk kesehatan, salah satunya adalah dapat berperan sebagai antioksidan. Kurkumin adalah senyawa lipofilik yang membuatnya menjadi pemulung radikal peroksil yang efisien. Seperti vitamin E, kurkumin dianggap sebagai antioksidan pemutus rantai pembentukan radikal bebas (Hewlings & Kalman, 2017; Kocaadam & Sanlier, 2017).

Kunyit mengandung kurkuminoid dan minyak atsiri yang telah terbukti berperan besar dalam aktivitas farmakologis. Kurkumin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, senyawa tersebut dapat berperan sebagai pembersih terhadap berbagai spesies oksigen reaktif termasuk anion superoksida, radikal nitrogen dioksida, proksinitrit (NOO), oksida nitrit (NO), radikal peroksil (ROO),

radikal hidroksil (OH⁻), dapat mendorong peningkatan regulasi protein antioksidan, mereka juga berperan menghambat peroksidasi lipid pada beberapa model hewan coba (Mosovska *et al.*, 2016; Samarghandian *et al.*, 2017). Efek kurkumin pada radikal bebas dilakukan melalui beberapa mekanisme, kurkumin dapat mengais berbagai bentuk radikal bebas, seperti ROS dan RNS, kurkumin juga dapat memodulasi aktivitas GSH, CAT, dan SOD yang merupakan enzim aktif dalam netralisasi radikal bebas. Kurkumin dapat menghambat enzim penghasil ROS seperti lipoksigenase/siklooksigenase dan xantin hidrogenase/oksidase (Hewlings & Kalman, 2017).

Penelitian yang dilakukan oleh Yuliani *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa pemberian etanol ekstrak kunyit dapat mencegah stres oksidatif pada hewan coba tikus dengan menurunkan kadar MDA plasma dan otak serta meningkatkan aktivitas enzim SOD, CAT, dan GPx serta kadar GSH di otak. Penelitian tersebut sejalan dengan studi yang dilakukan oleh Samarghandian *et al.*, (2017) bahwa kurkumin dapat mencegah kerusakan oksidatif di otak, hati dan ginjal tikus dengan cara bertindak sebagai antioksidan yang secara signifikan melemahkan stres oksidatif, menurunkan peroksidasi lipid, mencegah apoptosis dan meningkatkan mekanisme aktivitas pertahanan antioksidan di jaringan.

Gad El-Hak & Mobarak (2020) melaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan kadar antioksidan total testis dan meningkatkan kadar serum FSH pada tikus jantan. Penelitian tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nahari & Eisa (2016) yang menyebutkan bahwa curcuma longa dapat memperbaiki efek yang disebabkan oleh paparan AlCl₃ yang mengakibatkan penurunan signifikan kadar FSH, LH dan testosterone plasma dengan cara meningkatkan kadar FSH, LH dan testosterone plasma sehingga mendekati level normalnya.

2.9 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Penggunaan tikus sebagai model hewan coba di laboratorium dimulai pada tahun 1906 ketika Institut wistar mengembangkan model tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) (Sengupta, 2013). Tikus adalah spesies kedua yang paling sering digunakan dalam penelitian, karena perawatannya yang relatif mudah dan murah, bereproduksi dengan baik, dan genetiknya telah dikarakterisasi dengan baik. Selain itu aspek perilaku dan fisiologis tikus lebih relevan dengan manusia sehingga lebih mudah diamati (Hau & Scharpiro, 2013). Tikus yang sering digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dan Sprague-dawley (Nugroho *et al.*, 2018).

2.9.1 Taksonomi *Rattus norvegicus*

Hedrich (2020) mengklasifikasikan *rattus norvegicus* menjadi seperti berikut dibawah ini :

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Subfilum : Vertebrata
- Kelas : Mammalia
- Subkelas : Theria
- Ordo : Rodentia
- Subordo : Myomorpha
- Famili : Muridae
- Subfamili : Murinae
- Genus : Rattus
- Spesies : *Rattus norvegicus*

2.9.2 Fisiologi Umum

Tikus putih (*rattus norvegicus*) adalah hewan yang paling sering digunakan sebagai model dalam penelitian biomedis, karena dapat mewakili

sistem biologis mammal, maka hewan ini tepat dijadikan sebagai hewan coba dalam kajian praklinik. Dibawah ini akan dipaparkan fisiologi umum *Rattus norvegicus* yang terdiri dari keadaan fisik secara umum, parameter reproduksi dan yang terkait dengan gestasi (Sengupta, 2013)

Tabel 2.3 Data Fisiologi Umum dan Reproduksi *Rattus norvegicus*

Parameter	Keterangan
Keadaan Fisik secara umum	
Suhu tubuh	37°C
Pernafasan	75-115 kali/menit
Detak jantung	260-400 kali/menit
Konsumsi air/hari	10-12 ml/100g BB
Konsumsi makanan/hari	10 g/100 g BB
Jumlah anak	6-12
Berat lahir	5 g
Usia Menyapih	21 Hari
Usia kematangan seksual	7 minggu (~P49)
Durasi pembiakan	12-16 bulan
Berat tikus dewasa jantan	450-550 g
Berat tikus dewasa betina	250-300 g
Masa hidup	2.5-3.5 tahun
Parameter Reproduksi	
Tikus Jantan	
Usia saat kawin	8-10 minggu
Berat saat kawin	250-225 g
Tikus betina	
Usia saat kawin	8-10 minggu
Berat saat kawin	180-225 g
Lama siklus estrus	4-5 hari
Durasi siklus estrus	10-20 jam
Waktu ovulasi	8-11 jam setelah siklus estrus
Usia Menopause	15-18 bulan
Gestasi	
Waktu kawin	Dekat titik tengah <i>dark cycle</i> sebelumnya
Waktu sperma terdeteksi di vagina	Hari pertama
Waktu implantasi	Akhir hari ke-5
Usia gestasi	21-23 hari

Sumber : (Sengupta, 2013)

2.9.3 Kemiripan antara Usia Tikus dan Usia Manusia

Tikus sering digunakan dalam penelitian biomedis, oleh karena itu dalam penelitian yang menggunakan tikus sebagai hewan coba untuk mewakili manusia, maka harus ditentukan secara tepat korelasi antara usia tikus dan usia manusia, baik dalam hal usia maupun tahap kehidupannya. Tikus memiliki

kehidupan awal yang lebih pendek dan cepat dibandingkan dengan manusia, karena tahap perkembangan tikus tidak sama dengan manusia (Dutta & Sengupta, 2016).

2.9.4 Usia Reproduksi pada Tikus

Menurut Sengupta, *et al.*, (2013) Usia kematangan seksual sangat bervariasi, mulai dari 40 hari setelah lahir hingga 76 hari setelah lahir pada tikus jantan. Seperti pada manusia, tikus berkembang melalui masa remaja yang ditandai dengan perilaku seperti peningkatan pengambilan risiko dan permainan social. Perilaku ini setelah periode pubertas hingga transisi ke masa dewasa, yang dimulai setelah minggu kedelapan kehidupan pascakelahiran (P63). Berat badan hewan terkadang dianggap sebagai indicator usianya. Namun, berat badan bukanlah penanda yang akurat untuk usia. Pada tikus tidak ada penutupan efiasi pada tulang panjang, namun sekitar 7-8 bulan usia (± 210 hari) pertumbuhan kerangka berkurang pada tikus.

2.9.5 Siklus Reproduksi Tikus

Dalam penelitian yang berhubungan dengan fungsi reproduksi dan menggunakan tikus sebagai hewan coba maka penting untuk diketahui siklus estrus pada tikus. Siklus estrus dicirikan oleh perubahan morfologis pada ovarium, uterus dan vagina yang terjadi pada empat fase yaitu fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Aritonang *et al.*, 2017; Ajayi & Akhigbe, 2020).

1. Fase Proestrus

Fase Proestrus mirip dengan fase folikuler pada manusia dimana terjadi peningkatan konsentrasi estradiol yang bersirkulasi dan sedikit lonjakan prolaktin, hal ini menyebabkan peningkatan pelepasan LH dan FSH. Vagina tampak menganga dan jaringannya lembab serta berwarna merah muda, ada banyak lipatan atau lurik longitudinal yang terlihat pada bibir dorsal dan ventral (Ajayi & Akhigbe, 2020) pada fase proestrus di vagina juga banyak mengandung

sel epitel berinti dan leukosit, konsentrasi serum estradiol lebih tinggi dari semua tahap estrus lainnya (Aritonang *et al.*, 2017).

2. Fase Estrus

Pada fase estrus, vagina tampak mirip dengan yang ada pada proestrus, tetapi warnanya tidak terlalu merah muda, dan kurang lembab dengan lurik yang lebih menonjol. Pada uterus terjadi degenerasi/nekrosis sel epitel dan hilangnya aktivitas mitosis serta infiltrasi leukosit. Fase ini mempengaruhi ovarium yaitu terjadi degradasi korpusluteum dan menjadi tidak ada jaringan fibrosa. Selama fase estrus konsentrasi FSH meningkat dan penurunan yang cepat kadar estradiol, hal ini menyebabkan ovulasi. Konsentrasi estradiol secara signifikan lebih rendah dibanding pada fase proestrus, akan tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan fase metestrus (Ajayi & Akhigbe, 2020). Fase proestrus dan estrus tikus betina masing-masing berlangsung selama 12 jam (Paccola *et al.*, 2018).

3. Fase Matestrus

Selama matestrus, epitel endometrium uterus mengalami degenerasi vakuola tetapi terjadi mitosis kembali sehingga keduanya terlihat bersamaan, infiltrasi leukosit juga terjadi pada fase ini. Pada ovarium, korpus luteum masih terdapat rongga berisi cairan yang umumnya tidak memiliki jaringan fibrosa, dan sitoplasma korpusluteum bersifat kurang basofik apabila dibandingkan dengan fase diestrus. Pada Matestrus I jaringan vagina pucat dan kering, tidak terjadi pembengkakan pada fase estrus, sedangkan pada Matestrus II vagina terjadi keputihan yang melapisi dinding dalam vagina (Ajayi & Akhigbe, 2020). Fase matestrus berlangsung selama 21 jam, terdapat beberapa pendapat peneliti yang menyebutkan bahwa fase matestrus terdiri dari dua yaitu, Metestrus I (metestrus awal) berlangsung selama 15-18 jam dan metestrus II (atau metestrus akhir) berlangsung selama 6 jam (Paccola *et al.*, 2018). Selama fase matestrus,

konsentrasi estradiol serum secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan fase proestrus, konsentrasi LH cenderung lebih tinggi selama fase ini. Ketika kadar progesteron mulai meningkat dan ada lonjakan kecil pada kadar 17- β -estradiol sebagai respons terhadap aktivasi korpus luteum, menyebabkan regresi korpus luteum mengikuti penurunan tajam tingkat progesteron. Pada akhirnya, terjadi fase diestrus pada tikus dan kadar progesteron yang bersirkulasi mencapai puncaknya. Progesterone menghambat sekresi FSH sehingga folikel de graaf tidak terbentuk dan mencegah terjadinya estrus (Aritonang *et al.*, 2017).

4. Fase Diestrus

Diestrus merupakan periode istirahat singkat selama musim kawin (Ajayi & Akhigbe, 2020). Pada fase diestrus, vagina mengalami kekurangan sel kornifikasi dan terjadi peningkatan leukosit, lubang vagina yang sangat basah dan terkadang terlalu kecil dan tertutup pada beberapa tikus. Konsentrasi serum estradiol lebih rendah dibandingkan dengan fase proestrus, akan tetapi lebih tinggi dari fase metestrus (Aritonang *et al.*, 2017).

2.9.6 Bagian Otak Tikus

1. Forebrain (Prosencephalon)

a. Telencephalon

Telencephalon telah mengalami lebih banyak evolusi perubahan dibandingkan bagian otak lainnya. Paleopallium merupakan bagian cortex yang terlibat dalam penciuman. Ganglia basal yang meliputi nucleus kaudatus, putamen dan globus pallidus berkembang dari jaringan telencephalon tersebut.

Nucleus kaudatus dan putamen adalah bagian dari satu inti besar yang dikenal sebagai corpus striatum. Ganglia basal memiliki peran penting dalam mengontrol aktivitas otot. Hipokampus memiliki fungsi terkait dengan penciuman dan memori (Maynard & Downes, 2019).

b. *Diencephalon*

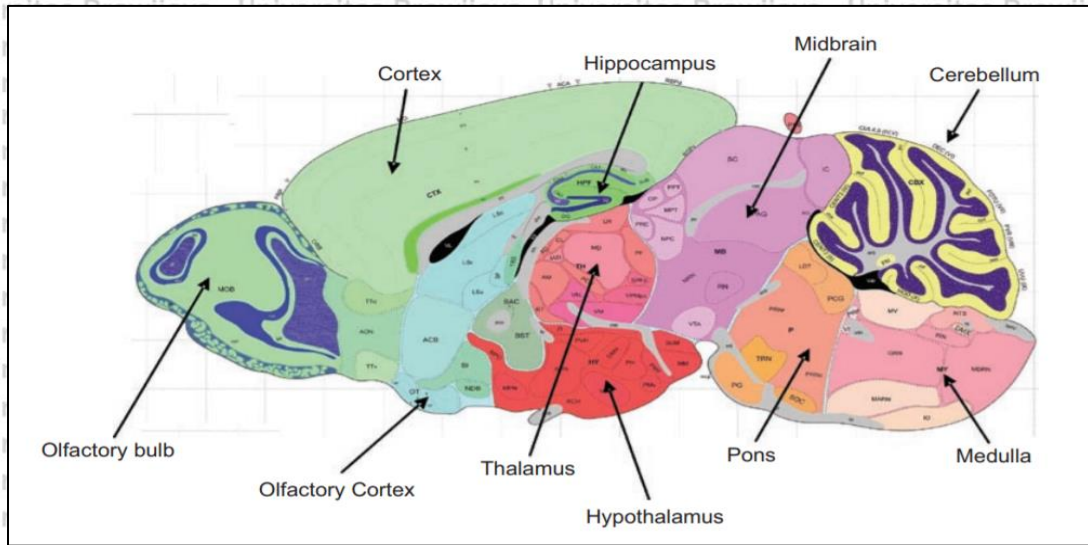
Diencephalon adalah bagian dari otak depan, yang berkembang dari vesikula serebral utama. Diencephalon terdiri dari talamus, hipotalamus, epitalamus dan subtalamus. Hipotalamus terletak di ventral talamus yang mengontrol fungsi fiseral termasuk nafsu makan, haus, perilaku seksual, sebagian besar sistem otonom dan neuro-endokrin. Secara anatomis hipotalamus dekat dengan kelenjar hipofisis. Salah satu fungsi terpenting hipotalamus adalah menghubungkan sistem saraf dengan sistem endokrin melalui kelenjar pituitari. Hipotalamus juga berperan sebagai pusat koordinasi respon terhadap rangsangan penciuman pada tikus (Maynard & Downes, 2019).

2. *Midbrain (Mesencephalon)*

Otak tengah (midbrain) menjadi elemen penting yang berperan sebagai titik penghubung antara wilayah-wilayah utama otak. Bagian ini terletak di dalam batang otak, yaitu diantara otak depan (forebrain) dan belakang (hindbrain). Otak tengah terdiri dari tektum, tegmentum, serta beberapa nucleus dan fasikuli (kumpulan saluran serabut saraf). Secara kaudal, otak tengah berbatasan dengan metencephalon (pons dan cerebellum), sedangkan rostrally berbatasan dengan diencephalon (talamus dan hipotalamus) (Maynard & Downes, 2019).

3. *Hindbrain (Rhombencephalon)*

Perkembangan rhombencephalon mengarah pada pembentukan dari medulla oblongata (myelencephalon: permukaannya putih), pons dan cerebellum (metencephalon). Pons menyediakan “jembatan” yang menghubungkan dua bagian otak kecil melalui tangkai serebelar tengah. Medula, pons dan mesencephalon membentuk batang otak (Maynard & Downes, 2019).



Gambar 2.14 Gambar Bagian Otak Tikus

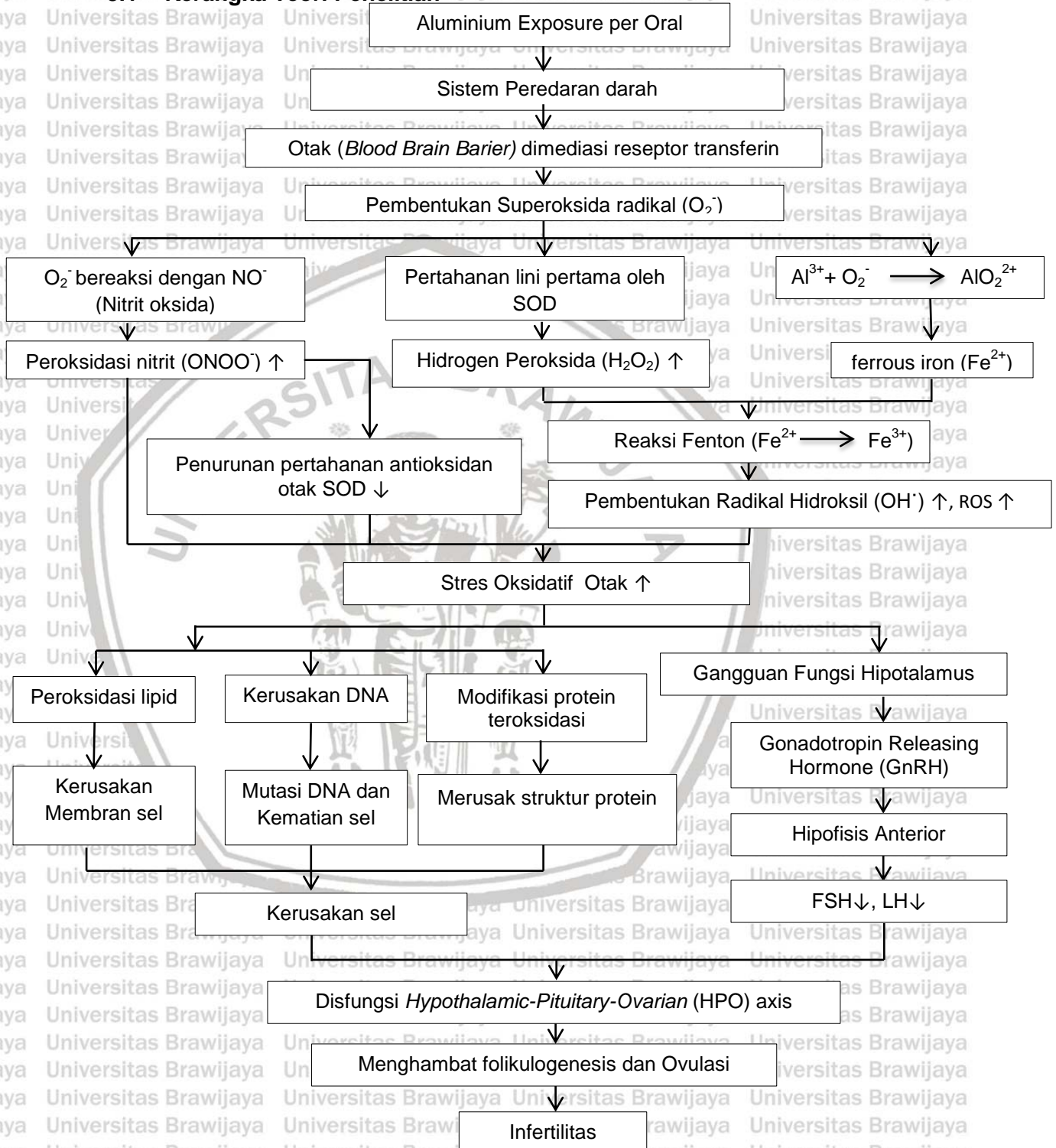
Keterangan : Beberapa bagian otak tikus yang terdiri dari *Olfactory bulb*, *olfactory cortex*, *cortex*, *hippocampus*, *thalamus*, *hypothalamus*, *midbrain*, *pons*, *cerebellum* dan medula (Heydel et al., 2010).



BAB 3

KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Teori Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Otak dan Kadar Follicle Stimulating Hormone (FSH) serum Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Aluminium

3.1.1 Keterangan kerangka Teori

Paparan aluminium melalui oral lewat minuman dan makanan merupakan salah satu jalur utama yang dilalui aluminium masuk kedalam tubuh (Vignat *et al.*, 2016). Absorpsi pada gastrointestinal merupakan jalur dimana aluminium akan terakumulasi secara sistemik (Igbokwe *et al.*, 2019). Setelah proses absorpsi, aluminium di distribusikan ke berbagai jaringan dan organ (Sjogren *et al.*, 2015). Salah satunya aluminium dapat terakumulasi di otak (Tietz *et al.*, 2019), dan darah merupakan salah satu agen pendistribusi utama aluminium (exley, 2013).

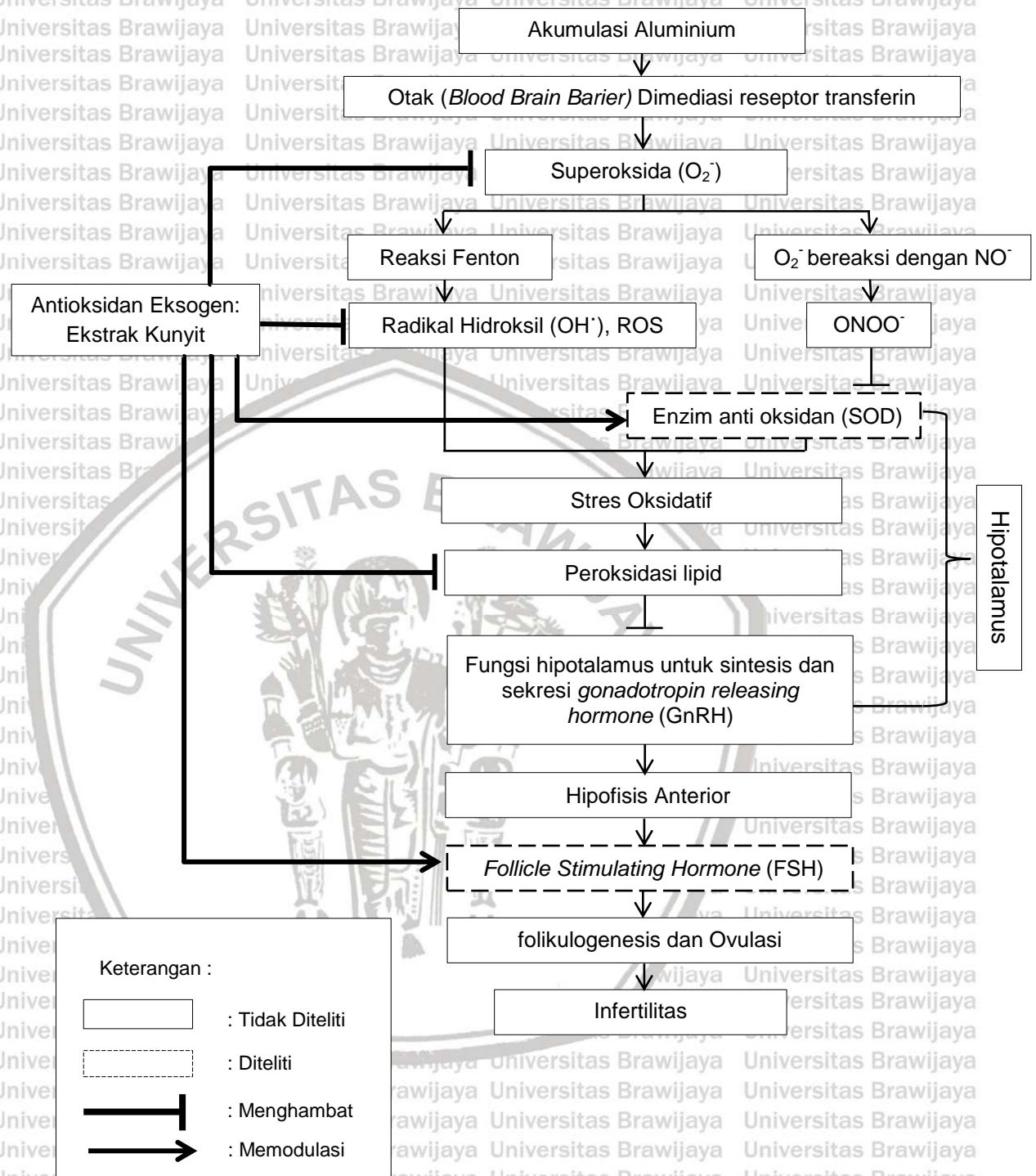
Aluminium dapat memasuki otak melalui beberapa rute, salah satunya dari darah melintasi *Blood Brain Barrier* (BBB) (Crisponi *et al.*, 2013), yang dimediasi reseptor transferrin (Drazba, 2019). Karakteristik aluminium (Al^{3+}) yang mirip dengan besi (Fe^{3+}), membuat aluminium secara kompetitif bersama Fe berikatan dengan transferrin memasuki sel otak melewati BBB (Kawahara & Kato-Negishi, 2011). Kemudian terjadi kompetisi antara aluminium dengan besi untuk berikatan di *binding site*, sehingga aluminium akan berikatan pada sisi yang sama dengan Fe^{3+} (Adityanti, 2018). Peristiwa tersebut menyebabkan peningkatan konsentrasi besi sehingga Al^{3+} dapat mengganggu homeostasis besi intraseluler (Igbokwe *et al.*, 2019). Anion superoksida (O_2^-) yang terus menerus dihasilkan melalui proses endogen dan sumber eksogen akan bereaksi dengan Al^{3+} , SOD dan NO. NO dan SOD akan bersaing untuk berikatan dengan O_2^- . Superoksida dapat langsung bereaksi dengan NO membentuk peroxynitrit ($ONOO^-$), dan $ONOO^-$ dapat menghambat SOD (Yuan *et al.*, 2012; Ighodaro & Akinloye, 2018; Ahmad *et al.*, 2019). Reaksi antara Al^{3+} dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan senyawa AlO_2^{2+} , setelah itu AlO_2^{2+} akan mengubah Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang kemudian akan meningkatkan stres oksidatif melalui reaksi fenton. Reaksi fenton merupakan reaksi antara Fe^{2+} dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dalam reaksi ini diproduksi Fe^{3+} , Radikal hidroksil (OH^{\cdot}) dan ion hidroksil (OH^-).

Radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi fenton merupakan bagian dari ROS yang akan menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan protein (Yuan *et al.*, 2012; Kanti Das *et al.*, 2015).

Produksi ROS yang diinduksi aluminium adalah mediator dari kerusakan pada otak (Han *et al.*, 2013). Aluminium menghasilkan radikal bebas berlebihan yang dapat merusak deoksiribonukleat dan meningkatkan *Lipid Peroxidation* (LPO) (Igbokwe *et al.*, 2019). SOD adalah enzim kunci dalam sistem antioksidan dan memainkan peran yang sangat penting dalam inaktivasi ROS (Kumar *et al.*, 2020). Dalam kondisi stres oksidatif, SOD berperan melawan superoksida dengan cara mengubah anion superoksida menjadi H_2O_2 dan O_2 . Oleh karena itu, Peningkatan LPO diartikan sebagai penghambatan aktivitas enzim antioksidan endogen seperti SOD, CAT, dan GPx di otak yang menyebabkan kerusakan membran (Amjad & Umesalma, 2015).

Stres oksidatif yang meningkat di hipotalamus menyebabkan gangguan sintesis dan sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) di hipotalamus. Gangguan tersebut menyebabkan kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH & LH. (Kardi, 2015). Kekurangan hormon FSH pada tikus betina dapat menghambat proses folikulogenesis yang mengakibatkan infertilitas (Coss, 2020) Stres oksidatif yang berlangsung dalam jangka panjang juga akan menyebabkan penurunan kualitas folikel dan penurunan fungsi ovarium (Steller *et al.*, 2018). Hipotalamus-pituitary-ovarium (HPO) axis adalah suatu sistem yang mengatur reproduksi wanita dengan memproduksi hormon gonadotropik dan steroid. Disfungsi dari HPO axis akan menyebabkan gangguan pada ovulasi yang berpengaruh pada infertilitas (Mikhael *et al.*, 2019).

3.2 Kerangka Konsep penelitian



Gambar 3.2 Kerangka Konsep Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) Otak dan Kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum Tikus Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Aluminium

3.2.1 Keterangan kerangka konsep

Paparan aluminium yang terlalu sering dan dalam jangka waktu yang lama akan menyebabkan akumulasi aluminium yang berlebih di beberapa jaringan dan organ tubuh, salah satunya adalah otak. Aluminium memasuki otak dimediasi oleh reseptor transeferin melewati *blood brain barrier*, di dalam otak aluminium terlibat dalam reaksi fenton melalui ikatannya dengan superoksida. Reaksi fenton menghasilkan radikal bebas yaitu radikal hidroksil (OH^\cdot) yang merupakan bagian dari ROS. Superoksida juga berikatan dengan NO dan menghasilkan ONOO⁻ yang dapat menghambat SOD.

Secara alamiah tubuh memiliki sistem pertahanan yaitu enzim antioksidan endogen salah satunya adalah SOD. SOD berperan dalam inaktivasi ROS melalui penguraian superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Pada saat dimana terdapat peningkatan produksi ROS yang tidak diseimbangkan dengan kapasitas enzim antioksidan endogen (SOD) maka akan terjadi stres oksidatif, kemudian menyebabkan peningkatan pembentukan peroksidasi lipid. Stres oksidatif yang terjadi di otak akan mempengaruhi fungsi hipotalamus yang menyebabkan gangguan sintesis dan sekresi *gonadotropin releasing hormone* (GnRH). Gangguan ini menyebabkan kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH & LH. Kekurangan FSH dapat menghambat folikulogenesis yang mengakibatkan infertilitas.

Kunyit mengandung kurkuminoid dan minyak atsiri yang telah terbukti berperan besar dalam aktivitas farmakologis. Salah satu kandungannya adalah

Kurkumin yang memiliki aktivitas antioksidan kuat yang dapat memutus rantai pembentukan radikal bebas, senyawa tersebut dapat berperan sebagai pembersih terhadap berbagai ROS termasuk anion superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil (OH^\cdot), dapat memodulasi aktivitas enzim antioksidan endogen yaitu SOD, menghambat peroksidasi lipid, dan kurkumin juga dapat berperan

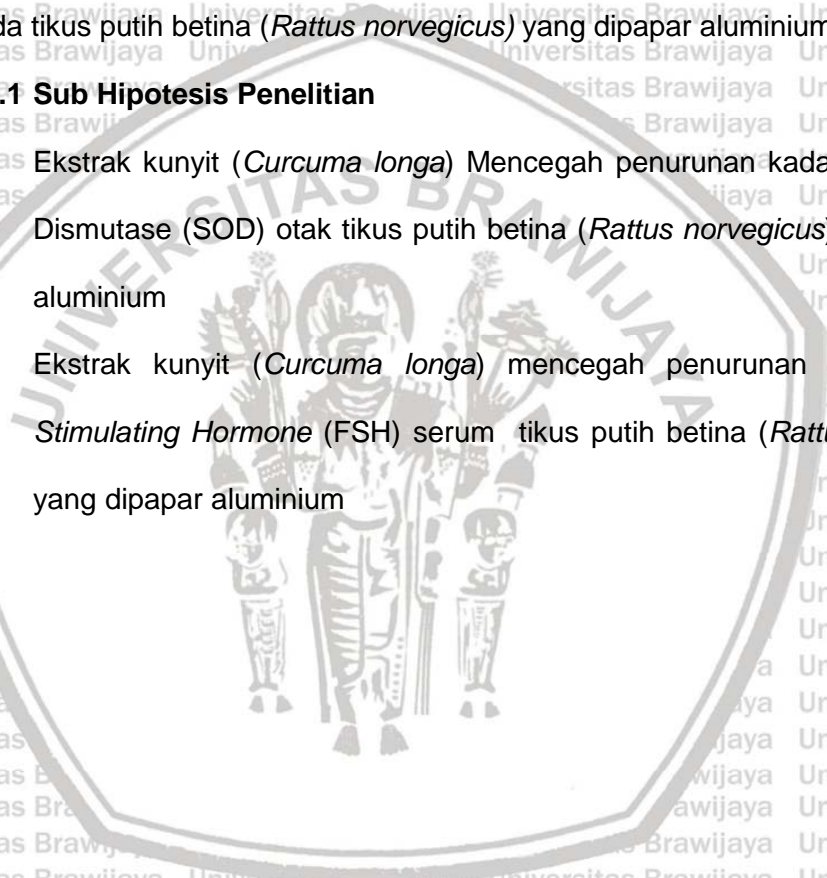
meningkatkan kadar FSH, sehingga pemberian curcuma longa dapat menormalisasi kadar FSH dalam darah untuk mendukung terjadinya folikulogenesis dan ovulasi yang dapat mencegah infertilitas.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) berpengaruh terhadap kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum pada tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium.

3.3.1 Sub Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) Mencegah penurunan kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium
2. Ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) mencegah penurunan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental, yaitu *true experimental* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

Penelitian eksperimental ini digunakan untuk menentukan perubahan kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium dengan dosis 100 mg/kg BB (Akhigbe & Ige, 2012; Mesole *et al.*, 2020). Sebelum dipapar aluminium, tikus diberikan ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dengan tiga dosis berbeda yaitu, 100mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 400 mg/Kg BB (Moghadam *et al.*, 2015; Yuliani *et al.*, 2019) selama 30 hari. Dosis Aluminium yang diberikan sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh mesole *et al.* (2020), dipilih karena paparan aluminium klorida dapat menyebabkan stres oksidatif pada otak yang ditandai dengan penurunan kadar SOD, dan penelitian yang dilakukan oleh Akhigbe & Ige (2012) dimana paparan aluminium klorida dapat mempengaruhi fungsi reproduksi dengan menurunkan kadar FSH.

4.2 Populasi dan sampel penelitian

4.2.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) strain wistar pada usia reproduksi yaitu 2-3 bulan. Tikus ini dipilih karena memiliki kemiripan dengan manusia mulai dari bentuk organ, fungsi, proses biofisik dan biokimia, mudah untuk dipelihara, relatif sehat serta cocok digunakan dalam berbagai jenis penelitian eksperimental.

4.2.2 Besar Sampel

Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok, dan sampel setiap kelompok dihitung berdasarkan rumus replikasi atau ulangan (Hanafiah, 2012).

Rumus

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

Keterangan :

t = Jumlah perlakuan ; r = Jumlah replikasi atau ulangan

Sehingga, sampel di setiap kelompok dapat dihitung sebagai berikut :

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4.75 \text{ (Dibulatkan menjadi 5)}$$

Dari perhitungan menggunakan rumus tersebut, maka didapatkan 5 sampel untuk setiap kelompok penelitian, sehingga sampel keseluruhan dari penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Besar sampel diperoleh dari mengalikan jumlah kelompok dengan jumlah replikasi.

4.2.3 Kriteria Inklusi, Eksklusi dan Drop Out

Dalam penelitian ini menggunakan kriteria inklusi, eksklusi dan dropout sehingga tikus yang menjadi sampel penelitian harus memenuhi kriteria inklusi, sebagai berikut:

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar berjenis kelamin betina
2. Usia reproduktif (2-3 bulan),
3. Berat badan 150-250 gram
4. Kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya aktif, tidak hamil dan tidak terdapat kecacatan secara anatomi.

Sampel yang memiliki kriteria eksklusi, harus dikeluarkan dari penelitian.

Adapun kriteria eksklusi adalah :

1. Tikus telah digunakan penelitian sebelumnya
2. Tikus tampak sakit sebelum perlakuan

Sampel yang memiliki kriteria drop out, harus dikeluarkan dari penelitian.

Adapun kriteria dropout adalah tikus hamil dan mati sebelum penelitian selesai.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan Laboratorium Farmakologi, laboratorium biomedik, laboratorium parasitologi, laboratorium patologi anatomi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar dan perlakuan terhadap hewan coba yaitu dengan pemberian ekstrak kunyit, pemaparan aluminium per oral, pembedahan dan pengambilan sampel.
2. Laboratorium Biomedik sebagai tempat preparasi sampel seblu dilakukan ELISA, yaitu pembuatan supernatant dari organ otak.
3. Laboratorium Parasitologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat untuk melakukan pengukuran kadar FSH serum pada (*Rattus norvegicus*) dengan menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).
4. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat untuk melakukan scan slide organ ovarium untuk melihat folikel sebagai data bersama.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama dua bulan dari bulan April-Juni 2021 yang dibagi menjadi 3 tahap yaitu satu minggu pertama digunakan untuk aklimatisasi, 4 minggu berikutnya digunakan untuk memberikan perlakuan pada sampel, dan sisa waktu berikutnya digunakan sebagai analisis data. Proses penelitian akan dilakukan setelah mendapatkan ijin etik dari komisi etik Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Variabel Bebas (*Independent*)

Dosis ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dan paparan Aluminium

2. Variabel Terikat (*Dependent*)

kadar Superoksida Dismutase (SOD) otak dan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) serum

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Skala Ukur
Aluminium	Aluminium yang digunakan adalah <i>Aluminium Chloride</i> (AlCl ₃) (Art. 801081, Schuchardt, 8011 Hohenbrunn Bei Munchen, Germany) dengan dosis 100 mg/KgBB, sediaan aluminium didapatkan dari 4 gram AlCl ₃ yang dilarutkan dalam 100 ml air suling (40mg/ml) (Akhigbe & Ige, 2012). Larutan AlCl ₃ tersebut diberikan 1 kali sehari selama 30 hari pada tikus secara oral menggunakan sonde.	Rasio
Ekstrak Kunyit (<i>Curcuma Longa</i>)	Ekstrak kunyit yang digunakan dalam penelitian ini diproses dengan menggunakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut ethanol. Ekstrak kunyit diberikan peroral setiap hari selama 30 hari dengan sonde yaitu dengan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/kgBB (Moghadam <i>et al.</i> , 2015; Yuliani <i>et al.</i> , 2019)	Rasio
Kadar (SOD) Superoksida Dismutase otak	Total Kadar Superoksida Dismutase (SOD) yang berada di organ otak tikus putih betina (<i>Rattus norvegicus</i>) galur wistar. Kadar SOD otak diukur menggunakan metode <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA), Elabscience Rat SOD1(Superoxide Dismutase 1, Soluble ELISA kit) dengan nomor catalog E-EL-R1424, hasilnya dalam satuan ng/mL	Rasio
Kadar FSH (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>) serum	Kadar FSH dalam darah yang diambil secara intrakardial melalui ventrikel kiri jantung, yang sebelumnya sudah dilakukan insisi pada daerah thorax tikus, tetapi dengan keadaan jantung masih berdenyut. Darah yang diambil kurang lebih 3 ml melalui spuit injeksi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang diberi antikoagulan EDTA, kemudian dipisahkan darah dengan plasmanya yang selanjutnya diukur dengan metode Elabscience Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone, ELISA kit) dengan nomor catalog E-EL-R0391	Rasio

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Pembagian hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan, dimana setiap kelompok berisi 6 ekor tikus. Pembagian kelompok dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Kelompok kontrol :

1. Kontrol negatif (KN): Diberikan 1 ml air suling. Tidak diberikan paparan aluminium dan tidak diberi ekstrak kunyit
2. Kontrol positif (KP): Kelompok ini dipapar aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB (Akhigbe & Ige, 2012; Mesole *et al.*, 2020) selama 30 hari, tidak diberi ekstrak kunyit.

Kelompok Perlakuan :

1. Kelompok 1 (P1) : Kelompok ini diberi ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB/hari kemudian dipapar aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB selama 30 hari
2. Kelompok 2 (P2) : Kelompok ini diberi ekstrak kunyit dengan dosis 200 mg/KgBB/hari kemudian dipapar aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB selama 30 hari
3. Kelompok 3 (P3) : Kelompok ini diberi ekstrak kunyit dengan dosis 400 mg/KgBB/hari kemudian dipapar aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB selama 30 hari.

4.6.2 Aklimatisasi tikus

Aklimatisasi tikus dilakukan selama 7 hari dengan tujuan agar tikus dapat beradaptasi dengan suasana laboratorium dan menghilangkan stres akibat transportasi. Tikus dibagi dalam 5 kelompok dan dimasukkan dalam kandang tanpa diberikan perlakuan tetapi tetap diberi makan dan minum.

4.6.3 Perawatan dan Pemeliharaan Tikus

1. Alat dan Bahan

- a. Spuit 3 ml yang bagian ujungnya dipasang sonde aluminium yang dapat dimasukkan ke dalam mulut sampai ke lambung tikus.
- b. Peralatan untuk pemeliharaan hewan coba yang terdiri dari kotak plastik yang digunakan sebagai kandang tikus, kawat berjaring yang digunakan sebagai tutup kandang dan botol tempat minum.
- c. Bahan yang terdiri dari sekam sebagai alas kandang, pakan pellet standar dan air untuk minum.

2. Cara kerja

- a. Tikus ditempatkan di kandang yang tampak dari luar (kotak plastik berukuran 37 cm x 50 cm x 12,5 cm) yang dialasi sekam dan dibersihkan atau diganti sekam setiap 2 kali per minggu dan ditutup dengan penutup kandang yang terbuat dari kawat berjaring.
- b. Sebelum tikus digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu harus dilakukan penyediaan pakan. Pakan tikus terbuat dari pakan standar berbentuk pellet, banyaknya pakan per hari yang disediakan 40 gr/hari yang diberikan pada pagi hari serta minum yang diberikan menggunakan botol kecil sebanyak 150 ml/ekor/hari, konsumsi tikus *ad libitum*. Sisa pakan dari pemberian hari sebelumnya tidak digunakan kembali. Penggantian alas sekam dilakukan seminggu dua kali untuk setiap kandang. Menciptakan suasana lingkungan yang stabil dengan ventilasi cukup dan suhu ruangan yang baik sesuai dengan kebutuhan fisiologis tikus antara 27°C-28°C.

4.6.4 Pemberian Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*)

1. Dosis Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*)

Dosis ekstrak kunyit yang digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Moghdam *et al.*, (2015) dengan dosis 100 mg/kgBB dan 200 mg/Kg BB dapat meningkatkan enzim antioksidan yaitu SOD, CAT dan GSH-Px serta penelitian yang dilakukan Yuliani *et al.*, (2019) melaporkan bahwa ekstrak etanol kunyit mencegah stres oksidatif, salah satunya dengan cara meningkatkan kadar SOD otak.

Untuk menemukan dosis ekstrak kunyit pada kelompok perlakuan maka menggunakan rumus deret ukur yaitu :

$$Y_N = Y_1 \times R^{N-1}$$

Keterangan:

Y_N : Dosis ke N

Y_1 : Kelompok ke

R : Faktor geometri (tidak boleh 0 ataupun 1)

Dosis yang digunakan adalah:

Dosis 1 : 100 mg/kg BB

Dosis 2 : $Y_1 \times R^{N-1}$

: $100 \times 2^{2-1}$

: 200 mg/kg BB

Dosis 3 : $Y_1 \times R^{N-1}$

: $100 \times 2^{2-1}$

: 400 mg/kg BB

2. Pembuatan Ekstrak Kunyit Menggunakan Pelarut Etanol

a. Bahan

Kunyit dan etanol 96% sebagai pelarut

b. Alat

Timbangan analitik, seperangkat alat ekstraksi, gelas beker, Kertas saring Whatman, corong penyaring, pengaduk, labu ukur, Erlenmeyer, rotary vakum evaporator, tabung reaksi, oven, ayakan 60 mesh.

c. Prosedur pelaksanaan ekstraksi kunyit menggunakan metode maserasi

1) Persiapan Sampel

a) Menyiapkan kunyit yang sudah dibersihkan kemudian diiris dengan ketebalan $\pm 3-5\text{mm}$ dan di blanching.

b) Kunyit yang sudah di blanching kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C selama 40 jam. Pengeringan dianggap selesai apabila bahan dapat mudah dipatahkan ketika diremas dengan tangan.

c) Kunyit yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender, selanjutnya diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Bubuk yang diperoleh selanjutnya diekstrak

2) Ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi

a) Masing-masing bubuk kunyit ditimbang sebanyak 50 g

b) Serbuk kunyit dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 250 ml dan dimasukkan dalam erlemayer. Kemudian larutan dikocok selama ± 30 menit sampai benar-benar tercampur, kemudian dimaserasi selama 2×24 jam sampai mengendap.

c) Larutan disaring menggunakan kertas whatman untuk memperoleh campuran pelarut dan zat aktif

3) Proses evaporasi

a) Filtrat yang didapat kemudian dievaporasi menggunakan rotary vakum evaporator dengan tujuan untuk menguapkan pelarut yang bercampur dengan bahan saat proses ekstraksi

- b) Water bath diisi air sampai penuh dan diatur suhunya sampai 90°C kemudian Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik
- c) Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi.
- d) Tunggu sampai larutan etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5-2$ jam) untuk satu labu (900ml)
- e) Hasil ekstraksi ditimbang dan kemudian dimasukkan kedalam botol plastik yang telah diberi label simpan dalam freezer

3. Pembuatan Sediaan Ekstrak Kunyit

Pemberian ekstrak kunyit pada setiap perlakuan menurut rata-rata berat badan tikus diasumsikan 150 gram adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok perlakuan 1

$$\frac{100}{x} \text{ mg} = \frac{1000}{150}$$

$$\text{Dosis 1} = 15 \text{ mg/ekor/hari}$$

- b. Kelompok perlakuan 2

$$\frac{200}{x} \text{ mg} = \frac{1000}{150}$$

$$\text{Dosis 2} = 30 \text{ mg/ekor/hari}$$

- c. Kelompok perlakuan 3

$$\frac{400}{x} \text{ mg} = \frac{1000}{150}$$

$$\text{Dosis 3} = 60 \text{ mg/ekor/hari}$$

Jika pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) akan diberikan selama 30 hari untuk 6 ekor tikus setiap dosisnya, maka perhitungan pengenceran ekstrak kunyit sebagai berikut:

- a. Dosis 1

$$\text{Besarnya ekstrak} : 15 \text{ mg} \times 6 \text{ ekor} \times 30 \text{ hari} = 2700 \text{ mg} = 2,7 \text{ g}$$

Volume ekstrak : 1 ml x 6 ekor x 30 hari = 180 ml

Maka pada dosis 100 mg/KgBB, sebanyak 2700 mg (2,7g) ekstrak kunyit diencerkan dalam 180 ml aquabides.

b. Dosis 2

Besar ekstrak : 30 mg x 6 ekor x 30 hari = 5400 mg = 5,4 g

Volume ekstrak : 1 ml x 6 ekor x 30 hari = 180 ml

Maka pada dosis 200 mg/KgBB, sebanyak 5400 mg (5,4 g) ekstrak kunyit diencerkan dalam 180 ml aquabides.

c. Dosis 3

Besar ekstrak : 60 mg x 6 ekor x 30 hari = 10.800 mg = 10,8 g

Volume ekstrak : 1 ml x 6 ekor x 30 hari = 180 ml

Maka pada dosis 400 mg/KgBB, sebanyak 10.800 mg (10,8 g) ekstrak kunyit diencerkan dalam 180 ml aquabides.

4. **Pemberian Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) pada tikus betina (*Rattus norvegicus*)**

a. Alat dan bahan: S spuit 5 ml yang diujungnya dipasang sonde yang dapat dimasukkan kedalam mulut sampai lambung tikus. Adapun bahannya adalah ekstrak etanol kunyit

b. Cara Kerja:

Pemberian ekstrak kunyit diberikan kepada 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok 1, 2 dan 3. Sebelum tikus diberi ekstrak kunyit, tikus ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca *ohaus* kemudian diberikan ekstrak kunyit dengan tiga dosis yaitu 100, 200 dan 400 mg/kgBB. Pemberian dilakukan secara oral dengan cara di sonde sebanyak 1 kali perhari yaitu 1 jam sebelum dipapar aluminium klorida, perlakuan ini dilakukan selama 30 hari.

4.6.5 Pemaparan Aluminium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*)

1. Pembuatan Larutan Aluminium

- Alat dan Bahan : Sentrifuge tube untuk tempat larutan, *magnetic stirrer*, AlCl_3 (Art. 801081, Schuchardt, 8011 Hohenbrunn Bei Munchen, Germany), dan air suling

b. Cara Kerja

Empat gram aluminium klorida dilarutkan dalam 100 ml air suling untuk membuat larutan stok (40 mg/ml). kemudian larutan AlCl_3 disimpan pada suhu 4°C.

2. Penghitungan dosis aluminium sesuai dengan Berat badan tikus

Dosis yang diberikan per ekor tikus adalah 100 mg/KgBB, sehingga jumlah aluminium yang diberikan per ekor tikus dengan rata-rata berat badan yang diasumsikan 150 gram adalah 15 mg aluminium dalam satu hari selama 30 hari.

3. Pemaparan Aluminium pada tikus betina (*Rattus norvegicus*)

- Alat : Timbangan berat badan neraca *ohaus*, spuit 5 cc dan sonde
- Bahan : Larutan aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB
- Cara Kerja:

Sebelum tikus dipapar aluminium, tikus ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca *ohaus* kemudian dipapar AlCl_3 dengan dosis 100mg/kgBB, diberikan secara oral menggunakan sonde diberikan 1 kali perhari selama 30 hari, pada kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan (kelompok 1, 2 dan 3).

4.6.6 Penentuan Fase Estrus

Homogenisasi siklus estrus dilakukan dengan cara pemberian PG600 24 jam sebelum hari ke-30. Pengambilan sampel sitologi mulai diambil setelah

perlakuan 30 hari, sampel yang diperoleh dengan mengambil jaringan epitel vagina tikus. Alat dan bahan yang dipersiapkan yaitu *cotton bud* (lidi kipas), cover glass, *methylene blue*, alcohol, NaCl 0,9% dan mikroskop. langkahnya adalah sebagai berikut:

1. *cotton bud* yang telah dibasahi larutan NaCl 0,9% diambil kemudian dimasukkan ke dalam vagina tikus betina dan melakukan pengusapan sebanyak 1-2 kali putaran
2. Hasil ulasan dari *cotton bud* dioleskan pada gelas objek dan dikeringkan, selanjutnya dilakukan pewarnaan pada preparat ulasan. setiap pengambilan sampel ulas vagina dibuat sebanyak 2 preparat ulasan untuk 1 ekor tikus
3. Preparat yang telah dikeringkan dimasukkan kedalam larutan alcohol absolut untuk difiksasi selama 3 menit kemudian diangkan, dicuci dengan air mengalir dan keringkan
4. Preparat tersebut dimasukkan ke dalam laruta *giemsa* selama 15 menit, kemudian diangkat dan dibilas dengan air mengalir, lalu diangin-anginkan, dan diamatin morfologi sel epitel di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.

4.6.7 Pengambilan Darah dan Organ Tikus

1. Alat yang digunakan adalah toples kaca tertutup, spuit disposable 1 ml, alat bedah (scapel, pinset, gunting), tabung sebagai tempat penyimpanan organ sementara.
2. Bahan yang diperlukan dalam hal ini adalah klorofom, ketamine, *netral buffer formalin* 10% untuk pengawetan organ otak
3. Prosedur pembedahan tikus dilakukan setelah 30 hari perlakuan dengan langkah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, kloroform, formalin 10% dan botol-botol tertutup untuk tempat organ tikus disimpan
- b. Tikus diterminasi injeksi ketamine 0,2 ml (10 mg/ml) secara IM dan ditunggu beberapa menit sampai tikus mati (tidak bergerak lagi).
- c. Tikus diletakan diatas alas papan, perut menghadap keatas dengan paku payung yang ditancapkan pada keempat telapak kaki. Dinding perut dibuka dengan menggunakan pinset dan gunting secara hati-hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kiri dan kanan pada sisi atas-bawah dan diafragma dibuka.
- d. Ambil darah secara intrakardial kurang lebih 3 ml melalui ventrikel kanan jantung dengan menggunakan spuit
- e. Darah yang telah diambil diletakkan ke tabung yang telah diberi antikoagulan EDTA lalu ditutup dengan sumbat karet
- f. Lakukan pembedahan didaerah kepala secara hati-hati hingga terlihat organ otak, kemudian diambil dan dimasukkan kedalam tabung
- g. Organ otak siap dikirim untuk pemrosesan menjadi preparat di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- h. Bangkai tikus dikubur petugas lab untuk mencegah pencemaran.

4.6.8 Pengukuran Kadar SOD otak dengan Metode ELISA

1. Alat dan Bahan untuk pengukuran kadar Superoxide Dismutase (SOD)
 - a. Inkubator dengan suhu 37°C
 - b. Kertas penyerap/Tissue
 - c. Pipet yang akurat dan disposable pipet tipis
 - d. EP tubes
 - e. *high-precision transferpettor*
 - f. *sentrifuse*
 - g. Aquadest

- h. Mikroplate reader dengan filter panjang gelombang 450 ± 10 nm
- i. Well yang telah dilapisi dengan antibody SOD tikus
- j. *Reagent; Standard solution, standard Diluent, Streptavidin-HRP, Stop solution, Fosfat buffered salin (PBS), wash buffer concentrate, Rat SOD antibody (rat SOD elisa kit merk Bioassay technology laboratory).*

k. Organ otak tikus

2. Prosedur pemeriksaan kadar SOD dengan metode ELISA

Metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) adalah suatu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Metode ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu. Penelitian ini menggunakan *rat total SOD elisa kit merk elabscience*.

a. Homogenisasi Jaringan

- 1) Jaringan otak dibilas dengan *Fosfat buffered salin (PBS)* dengan pH 7,4 untuk menghilangkan sel darah merah, endapan atau gumpalan.
- 2) Homogenisasi jaringan pada buffer HEPES (dingin) konsentrasi 20 mM, pH 7,2 yang mengandung 1 mM EGTA, 210 nM mannitol, dan 70 mM sukrosa
- 3) Di sentrifuge selama duapuluh menit dengan 1.000 xg pada suhu 2-8°C
- 4) Supernatan diambil untuk pengujian, sampel harus diuji dalam 7 hari bila disimpan pada suhu 2-8°C. apabila disimpan dalam suhu -20°C dapat bertahan ≤ 1 bulan, atau disimpan dalam suhu -80°C dapat bertahan ≤ 3 bulan.

b. Persiapan Reagen

- 1) Bawa semua reagen ke suhu kamar (18 -25 °C) sebelum digunakan. Dan panaskan terlebih dahulu selama 15 menit sebelum pengukuran OD.
- 2) *Wash buffer* :

Encerkan 30 mL Concentrated Wash Buffer dengan 720 mL air deionisasi atau air suling untuk membuat 750 mL Wash Buffer. Catatan: jika sudah terbentuk kristal di dalam konsentrat, hangatkan dalam pemanas air 40°C dan aduk perlahan sampai kristal telah larut sepenuhnya

3) *Standard working solution:*

Sentrifugasi standar pada 10.000 x g selama 1 menit. Tambahkan 1 mL Standar Referensi & Sample Pengencer, diamkan selama 10 menit dan balikkan perlahan beberapa kali. Setelah larut sepenuhnya, aduk rata dengan pipet. Pemulihan ini menghasilkan larutan kerja 10 ng / mL.

Kemudian buat pengenceran sesuai kebutuhan. Gradien pengenceran yang disarankan adalah sebagai berikut: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0 ng / mL.

4) *Biotinylated Detection Ab working solution:*

Hitung jumlah yang diperlukan sebelum percobaan (100 µL/sumur).

Dalam persiapan, harus disiapkan sedikit lebih dari yang dihitung.

Sentrifugasi tabung stok sebelum digunakan dan encerkan 100 x.

5) *Concentrated HRP Conjugate working solution*

Hitung jumlah yang diperlukan sebelum percobaan (100 µL/sumur).

Dalam persiapan, harus disiapkan sedikit lebih dari yang dihitung.

Sentrifugasi tabung stok sebelum digunakan dan encerkan 100 x

Concentrated HRP Conjugate working solution 1 x dengan pengencer konjugasi HRP terkonjugasi

c. *Prosedur Assay*

- 1) Tambahkan larutan kerja standar ke dua kolom pertama: Setiap konsentrasi larutan ditambahkan duplikat, ke satu lubang masing-masing, berdampingan (100 uL untuk setiap lubang). Tambahkan sampel ke

sumur lainnya (masing-masing 100 μL setiap well). Tutupi pelat dengan sealer yang disediakan dalam kit. Inkubasi selama 90 menit pada 37 $^{\circ}\text{C}$.

2) Keluarkan cairan dari masing-masing sumur, jangan dicuci. Segera tambahkan 100 μL *Biotinylated Detection Ab working solution* untuk setiap sumur. Tutupi dengan sealer Plat. Campur dengan lembut dan Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$.

3) Aspirasi atau tuang larutan dari setiap sumur, tambahkan 350 μL *wash buffer* ke setiap sumur. Rendam selama 1-2 menit dan aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing wadah dan tepuk-tepuk hingga kering pada kertas penyerap yang bersih. Ulangi langkah pencucian ini 3 kali.

4) Tambahkan 100 μL larutan kerja HRP Conjugate ke setiap sumur. Tutupi dengan sealer Plat. Inkubasi selama 30 menit pada 37 $^{\circ}\text{C}$.

5) Aspirasi atau tuang larutan dari masing-masing well, ulangi proses pencucian sebanyak lima kali seperti yang dilakukan pada langkah 3.

6) Tambahkan 90 μL Reagen Substrat ke setiap lwell. Tutupi dengan sealer pelat baru kemudian inkubasi selama sekitar 15 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ dan lindungi piring dari cahaya.

7) Tambahkan 50 μL *stop solution* ke setiap lubang.

8) Tentukan densitas optik (nilai OD) setiap sumur sekaligus dengan pembaca pelat mikro diatur ke 450 nm.

4.6.9 Pengukuran Kadar FSH dengan menggunakan metode ELISA

Untuk mengukur kadar FSH digunakan *Rat Follicle Stimulating Hormone*

ELISA kit dari Bioassay Technology Laboratory, kit ini untuk deteksi kuantitatif yang akurat jumlah hormone FSH dalam serum, plasma, supernatant kultur sel, sel-sel lysis atau homogenate jaringan.

1. Prinsip Assay

Kit ini adalah Immunosorbent Assay (ELISA) terkait enzim. Piring telah dilapisi dengan antibody FSH tikus. FSH yang ada dalam sampel ditambahkan dan mengikat antibody yang telah ditempelkan pada well.

2. Alat dan bahan :

- a. Inkubator dengan suhu 37°C
- b. Kertas penyerap/Tissue
- c. Pipet yang akurat dan disposable pipet tipis
- d. Tabung
- e. Aquadest
- f. Mikroplate reader dengan filter panjang gelombang 450 ± 10 nm
- g. Well yang telah dilapisi dengan antibody FSH tikus
- h. *Reagent; Standard solution, standard Diluent, Streptavidin-HRP, Stop solution, substrate solution A, substrate solution B, wash buffer concentrate, biotinylated Rat FSH antibody*

3. Mengumpulkan Sampel

- a. Serum; biarkan serum menggumpal selama 10-20 menit pada suhu kamar. *Contrifuge* pada 200-3000 RPM selama 20 menit
- b. Plasma; mengumpulkan plasma menggunakan EDTA atau heparin sebagai antikoagulan. *Contrifuge* dengan kecepatan 2000 – 3000 RPM pada suhu 2 – 8 °C selama 30 menit.

4. Persiapan Reagent (Bahan reaksi)

- a. Semua reagent harus disiapkan dalam suhu ruangan sebelum digunakan
- b. Standar; menyusun kembali 120 ml larutan standar (64mIU/ml) dengan 120 ml pengencer standar untuk menghasilkan larutan stok standar 32 mIU/ml. Kemudian, biarkan standar selama 15 menit agar tercampur sempurna sebelum melakukan pengenceran. Siapkan duplikat poin

standar dengan mengencerkan larutan stok standar (32 mIU/ml) 1 : 2 dengan pengencer standar untuk menghasilkan 16 mIU/ml, 8 mIU/ml, solusi 4 mIU/ml dan 2 mIU/ml. pengenceran standar berfungsi sebagai standar nol (0 mIU/ml).

- c. *Wash Buffer*, encerkan 20 ml konsentrasi *wash buffer* 25 kali ke dalam air suling untuk menghasilkan 1x500 ml *wash buffer*, jika Kristal telah terbentuk dalam konsentrasi, aduk perlahan sampai Kristal benar-benar larut.

5. Prosedur Assay

- a. Menyiapkan semua bahan reagen, larutan standar, dan bahan sampel sesuai petunjuk. Sesuaikan dengan suhu ruangan sebelum digunakan. Prosedur assat dikerjakan di suhu ruang.
- b. Menentukan jumlah strips yang akan digunakan, yang tidak digunakan harus disimpan dalam suhu 2-8°C
- c. Menambahkan 50 µl standar ke well standar, dengan catatan jangan tambahkan antibodi ke dalam sampel well karena larutan standar mengandung antibody yang terbiotinilasi.
- d. Menambahkan 40 µl sampel ke well sampel, lalu tambahkan 10 µl anti-FSH antibody ke well sampel dan well standar (bukan well kontrol kosong), campur dengan baik dan tutup, selanjutnya inkubasi selama 60 menit di suhu 37°C.
- e. Setelah diinkubasi buka penutupnya, buang larutan yang ada di well tadi kemudian cuci dengan *wash buffer* sebanyak 5 kali. Rendam well dengan setidaknya 0,35 ml *wash buffer* selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap kali mencuci. Untuk pencucian otomatis, aspirasi semua well dan cuci 5 kali dengan *wash buffer*, penuh kembali well dengan *wash buffer*. Tekan kuat dengan kertas penyerap atau *tissue* untuk mengerikan.

- f. Menambahkan 50 μ l *substrate solution A* ke dalam tiap well, juga tambahkan 50 μ l *substrate solution B* ke dalam tiap well. Inkubasi dan tutup dengan penutup baru selama 10 menit di suhu 37°C dalam keadaan gelap.
- g. Setelah inkubasi, menambahkan *stop solution* ke dalam tiap well, warna biru akan berubah dengan cepat menjadi warna kuning.
- h. Menambahkan kepadatan optik (Nilai OD) dari tiap-tiap well dengan segera menggunakan *microplate reader* yang diatur ke 450 nm dalam waktu 10 menit setelah menambahkan *stop solution*.

6. Penghitungan hasil

Hasilnya dianalisa dengan membuat kurva standar dengan memplot rata-rata kepadatan optik untuk setiap standar pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan gambar kurva terbaik melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini dilakukan dengan computer berbasis *Curve Fitting Software* dan garis paling atas dapat ditentukan dengan analisis regresi (*User Instruction, Bioassay Technology Laboratory*)

4.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan 3 tahapan penghitungan. Adapun 2 tahapan berturut-turut yaitu (1) uji normalitas data sampel dengan uji *shapiro wilk*, uji homogenitas menggunakan uji *levene* (2) uji *Anova One Way* (uji F) (bila data berdistribusi normal atau *Kruskal Wallis* (bila data tidak berdistribusi normal). Semua perhitungan dilakukan dengan bantuan *software SPSS for Windows 26*.

a. Uji Prasyarat Parametrik

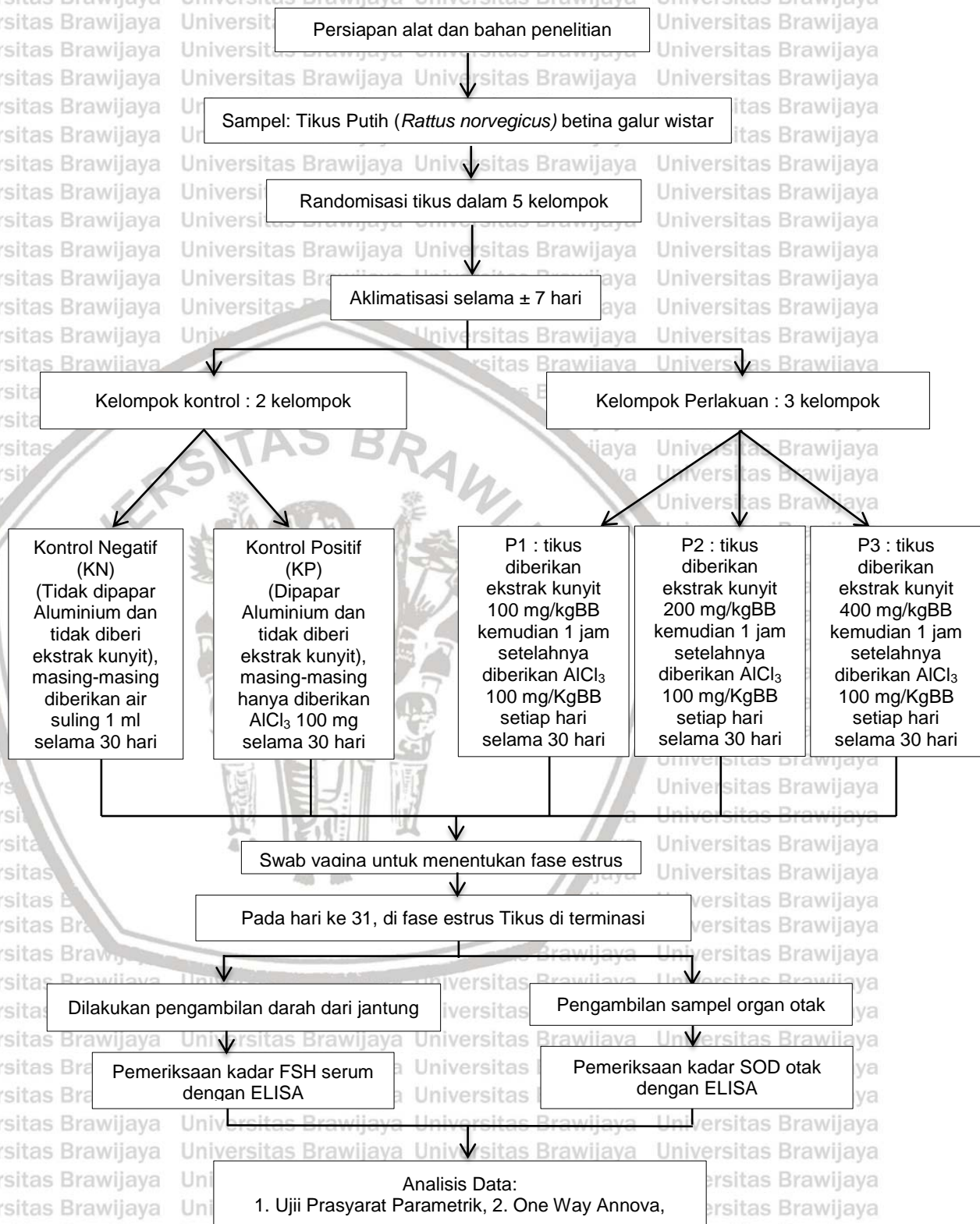
Uji prasyarat parametric digunakan untuk mengetahui sebaran atau distribusi data normal dan homogen, dilakukan sebelum uji hipotesa. Dalam

penelitian ini menggunakan uji normalitas data dengan uji *Shapiro wilk*, karena sampel dalam penelitian < 50 . Kriteria keputusan pada uji ini dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada *p-value*. Jika $P > 0.05$ maka disimpulkan data berdistribusi normal, sehingga uji parametric dapat digunakan. Sedangkan, jika nilai *p-value* $P < 0.05$ kesimpulannya data tidak berdistribusi normal. Uji homogenitas adalah suatu uji yang dilakukan untuk mengetahui bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki varians sama (homogen), dalam hal ini menggunakan uji *Levene*. Kriteria keputusan pada uji homogenitas *Levene* adalah jika nilai $\text{Sig} > 0,05$ maka dapat disimpulkan data homogeny. Adapun variable terukur yang diuji dengan uji prasyarat parametrik adalah data kadar SOD otak dan kadar FSH serum tikus betina *Rattus norvegicus* galur wistar.

b. Uji *One Way Annova*

Uji *One Way Annova* (Uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variable terukur antara kelompok kontrol positif (paparan Aluminium dengan dosis 100 mg/kg BB) dengan kelompok perlakuan (3 kelompok yang diberikan paparan Aluminium dan ekstrak kunyit dengan berbagai dosis). Analisis ini dilakukan terhadap data kadar SOD otak dan kadar FSH serum. Tujuan teknik analisis ini digunakan untuk mengetahui apakah ekstrak kunyit berpengaruh terhadap kadar SOD otak dan kadar FSH serum pada tikus yang dipapar aluminium. Apabila pada Uji *One Way Annova* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak dan H_a diterima atau dengan kata lain ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, dalam hal ini dipilih uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (*Least significant Difference/LSD*). Uji *LSD* ini digunakan untuk menentukan dosis ekstrak kunyit yang paling berpengaruh terhadap kadar SOD otak dan FSH serum tikus *Rattus norvegicus* galur wistar.

4.8 Alur penelitian



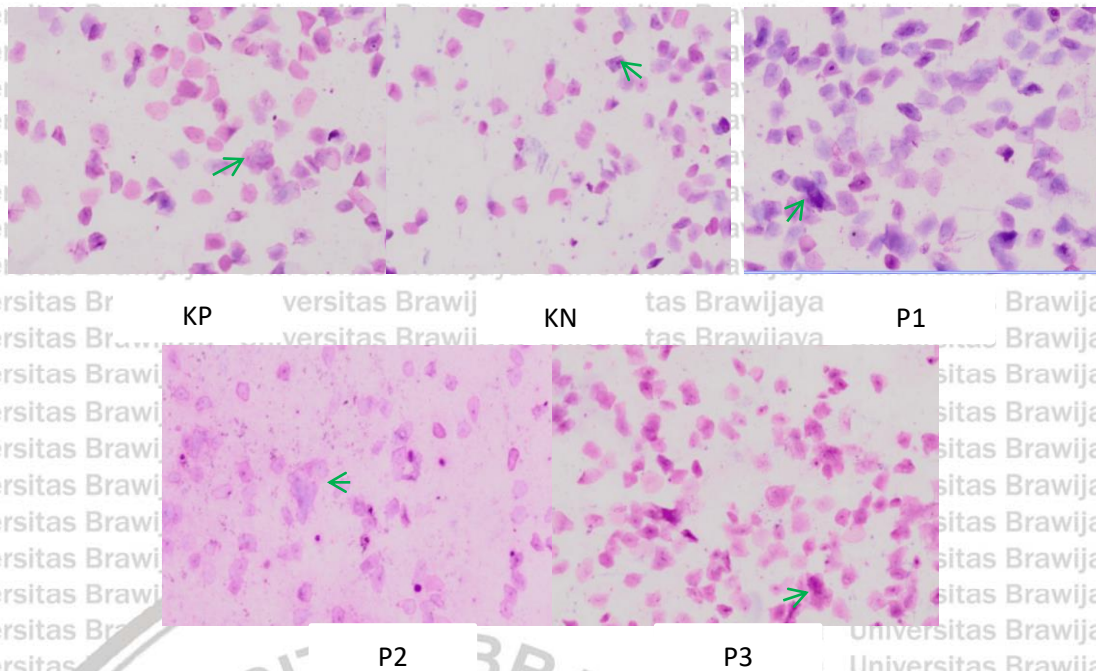
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, laboratorium biomedik, laboratorium parasitologi, laboratorium patologi anatomi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April-Juni 2021. Penelitian ini merupakan penelitian experimental dengan menggunakan *post test only control group design* dengan *in vivo* yang dikerjakan dilaboratorium untuk mengetahui pengaruh ekstrak kunyit (*curcuma longa*) terhadap kadar SOD (*superoksida dismutase*) otak depan dan kadar FSH (*follicle stimulating hormone*) serum tikus putih betina (*rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium.

5.1 Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini tikus putih betina (*Rattus Norvegicus*) galur wistar dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol positif (KP), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3). Sebelum diberikan perlakuan, tikus terlebih dahulu diaklimatisasi selama 7 hari. Pemaparan $AlCl_3$ dengan dosis 100 mg/KgBB/hari dan pemberian ekstrak kunyit dilakukan selama 30 hari, kemudian pada hari ke 31 perlakuan dihentikan dan dilanjutkan pemeriksaan swab vagina untuk menentukan fase estrus sebelum dilakukan pembedahan. Berikut ini adalah hasil swab vagina fase estrus dari 5 kelompok.



Gambar 5.1 Hasil Swab Vagina Fase Estrus pada Kelompok Sampel

Keterangan : Panah Hijau menunjukkan sel epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan. Pada fase estrus preparat apusan vagina ditandai dengan hilangnya leukosit dan epitel berinti, yang ada hanya sel epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan. (Gambar diambil pada pebesaran 400x)

5.2 Hasil pengukuran Kadar SOD Otak Tikus putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Aluminium dan Pemberian Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*)

Pengaruh pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap kadar SOD yang dipapar aluminium menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 450nm, Kit yang digunakan adalah Elabscience Rat SOD1(Superoxide Dismutase 1, Soluble ELISA kit) dengan nomor catalog E-EL-R1424

5.2.1 Hasil Uji Prasyarat parametrik kadar SOD otak

Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-wilk*, sedangkan uji homogenitas dengan *Lavene test*. interpretasi atau kriteria keputusan pada Uji normalitas dan homogenitas, yaitu apabila *p-value* lebih dari (>) taraf signifikansi α (0.05) maka data berdistribusi normal dan homogen, sebaliknya apabila *p-value* kurang dari (<) taraf signifikansi α (0.05) maka data

tidak berdistribusi normal dan homogen. Apabila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, maka analisis selanjutnya digunakan uji non parametrik. Berikut table 5.1 menjelaskan hasil analisis uji *Shapiro-wilk* dan *Lavene test*.

Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar SOD otak Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium

Kelompok Pengamatan	<i>p-value</i> Uji Shapiro-wilk	Distribusi	<i>p-value</i> Lavene Test	Homogenitas Data
Kontrol Negatif (KN)	0,594	Normal		
Kontrol Positif (KP)	0,327	Normal		
P1	0,762	Normal	0.333	Homogen
P2	0,076	Normal		
P3	0,409	Normal		

Keterangan : Jika $p\text{-value} > 0.05$ data terdistribusi normal dan jika $p\text{-value} < 0.05$ maka data tidak terdistribusi normal

Pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa data kadar SOD otak pada setiap kelompok menunjukkan nilai $p\text{-value}$ lebih besar dari 0.05 ($p\text{-value} > 0.05$) pada keseluruhan data. Terbukti bahwa semua data berdistribusi normal. Berdasarkan uji *Lavene statistic* menunjukkan nilai $p\text{-value}$ 0.333 yang berarti lebih besar dari 0.05 ($p\text{-value} > 0.05$), menunjukkan bahwa data homogen. Hasil kedua uji prasyarat parametric tersebut, memenuhi uji prasyarat parametric. Selanjutnya data dianalisis dengan uji parametric untuk membuktikan hipotesis penelitian.

5.2.2 Hasil Uji Perbandingan Kadar SOD Otak

Pada tahap ini digunakan uji *Annova One Way*, karena pada uji prasyarat parametric telah memenuhi ketentuan yang berlaku. Perbandingan rerata kadar SOD pada kelima kelompok pengamatan dengan menggunakan uji *Annova One Way* diperoleh ada perbedaan yang bermakna, hal tersebut dibuktikan dengan nilai $p\text{-value} = 0,023 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata terkecil (BNT) atau *Least significant Difference* (LSD).

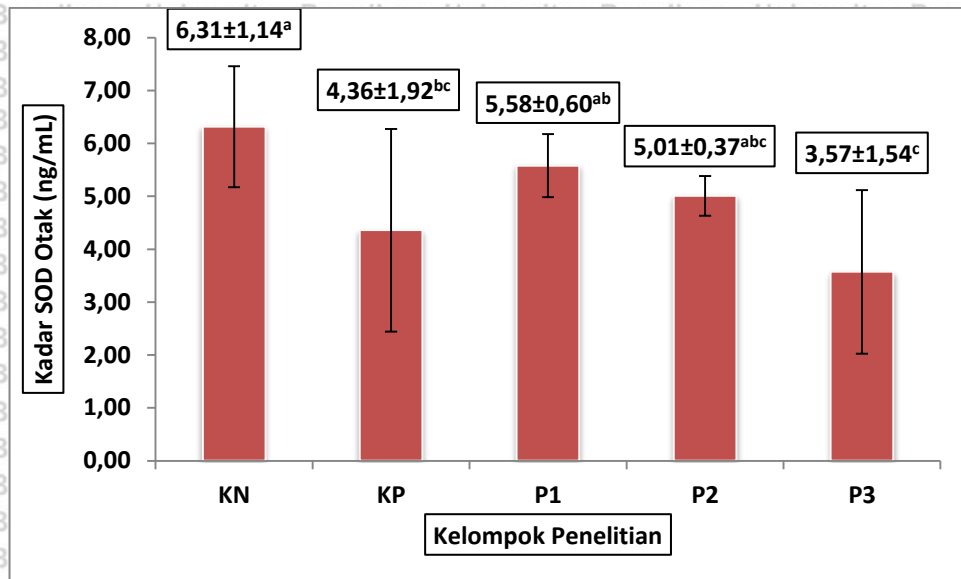
Tabel 5.2 Hasil uji One Way Anova Kadar SOD Otak Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium

Kelompok Sampel	N	Rerata SOD (U/ml) ± SD	p-value
Kontrol Negatif (KN)	5	6,31 ± 1,14 ^a	0,023
Kontrol Positif (KP)	5	4,36 ± 1,92 ^{bc}	
P1	5	5,58 ± 0,60 ^{ab}	
P2	5	5,01 ± 0,37 ^{abc}	
P3	5	3,57 ± 1,54 ^c	

Keterangan : Kontrol negatif (KN) diberikan 1 ml air suling saja; Kontrol positif (KP) dipapar aluminium dosis 100 mg/KgBB; Kelompok perlakuan 1 (P1) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB/hari. Kelompok perlakuan 2 (P2) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 200 mg/KgBB/hari. Kelompok perlakuan 3 (P3) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 400 mg/KgBB/hari. rerata SOD±SD jika memuat huruf yang berbeda maka ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}>0.05$).

Pada tabel 5.2 menunjukkan kadar SOD otak pada kelompok yang tidak terpapar aluminium (kontrol negative/KN) dibandingkan dengan kelompok yang terpapar aluminium 100 mg/KgBB (kontrol positif/KP) mengalami penurunan, dengan nilai rerata $6,31 \pm 1,14$ menjadi $4,36 \pm 1,92$. Tampak bahwa penurunan kadar SOD pada kelompok kontrol positif (KP) tersebut bermakna, hal ini menjelaskan bahwa paparan aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB pada hewan coba tikus putih betina menyebabkan penurunan kadar SOD. Rerata kadar SOD pada pemberian ekstrak kunyit dengan dosis 1 di kelompok P1 ($5,58 \pm 0,60$) dan pada kelompok P2 ($5,01 \pm 0,37$) memperlihatkan peningkatan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif namun tidak bermakna. Akan tetapi rerata kadar SOD pada pemberian ekstrak kunyit dosis 3 di kelompok P3 ($3,57 \pm 1,54$) mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Selanjutnya rerata kadar SOD pada kelima kelompok tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram dibawah ini :



Gambar 5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak kunyit dan Paparan aluminium terhadap kadar SOD

Keterangan : Kontrol positif (KP) lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol negatif. Pada kelompok P1 dan P2 memiliki rerata kadar SOD mendekati kelompok kontrol negatif. Adanya notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

5.3 Hasil pengukuran Kadar FSH Serum Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Aluminium dan Pemberian Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*)

Pengaruh pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap kadar FSH yang dipapar aluminium menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang 450nm, Kit yang digunakan adalah *Elabscience rat FSH(Follicle Stimulating Hormone)* ELISA kit dengan katalog nomor E-EL-R0391.

5.3.1 Hasil Uji Prasyarat parametrik kadar FSH Serum

Uji prasyarat parametrik dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-wilk*, dan *Lavene test*. interpretasi atau kriteria keputusan pada uji *Shapiro-wilk*, dan *Lavene test*, yaitu apabila *p-value* lebih dari (>) taraf signifikansi α (0.05) maka data berdistribusi normal dan homogen, sebaliknya apabila *p-value* kurang dari (<) taraf signifikansi α (0.05) maka data tidak berdistribusi normal dan homogen.

Apabila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, maka analisis selanjutnya

digunakan uji non parametrik. Berikut tabel 5.3 menjelaskan hasil analisis uji *Shapiro-wilk* dan *Lavene test*:

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar FSH Serum Tikus Putih Betina yang Dipapar Aluminium dan Diberikan Ekstrak Kunyit

Kelompok Pengamatan	<i>p-value</i> Uji Shapirowilk	Distribusi	<i>p-value</i> Lavene Test	Homogenitas Data
Kontrol Negatif (KN)	0.724	Normal		
Kontrol Positif (KP)	0.105	Normal		
PI	0.302	Normal	0.062	Homogen
PII	0.407	Normal		
PIII	0.668	Normal		

Keterangan : Jika $p\text{-value} > 0.05$ data terdistribusi normal dan jika $p\text{-value} < 0.05$ maka data tidak terdistribusi normal

Pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa data kadar FSH pada setiap kelompok menunjukkan nilai $p\text{-value}$ lebih besar dari 0.05 ($p\text{-value} > 0.05$) di keseluruhan data. Terbukti semua data berdistribusi normal. Berdasarkan uji *Lavene statistic* menunjukkan nilai $p\text{-value}$ 0,062 yang berarti lebih besar dari 0.05 ($p\text{-value} > 0.05$), menunjukkan data terdistribusi homogen. Hasil kedua uji prasyarat parametric tersebut, memenuhi uji prasyarat parametrik. Selanjutnya data dianalisis dengan uji parametric untuk membuktikan hipotesis penelitian.

5.3.2 Hasil Uji Perbandingan Kadar FSH Serum

Pada tahap ini digunakan uji *One Way Anova*, karena pada uji prasyarat parametric telah memenuhi ketentuan yang berlaku. Perbandingan rerata kadar FSH pada kelima kelompok pengamatan dengan menggunakan uji *One Way Anova* diperoleh ada perbedaan yang bermakna, hal tersebut dibuktikan dengan nilai $p\text{-value} = 0,018 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata terkecil (BNT) atau *Least significant Difference* (LSD).

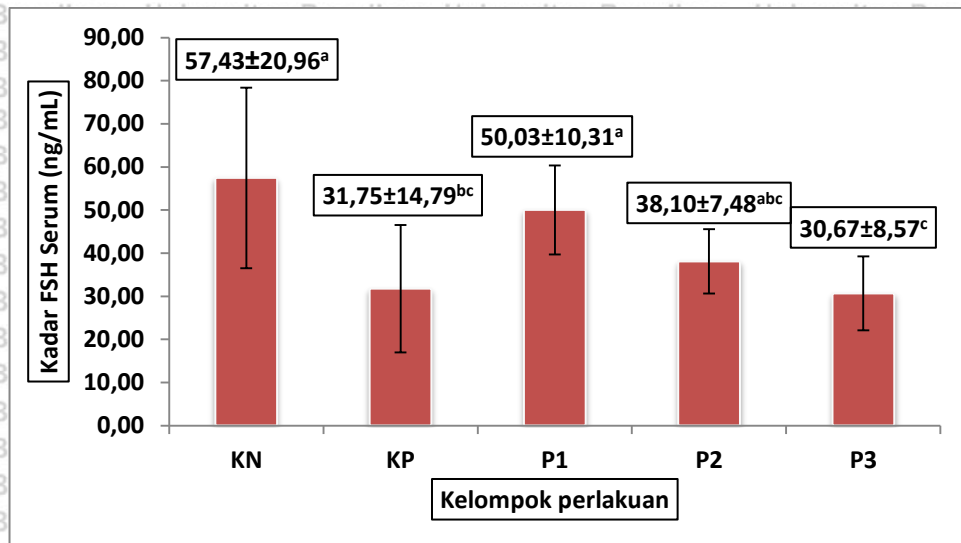
Tabel 5.4 Hasil uji One Way Annova Kadar FSH Serum Tikus Putih Betina yang yang Dipapar Aluminium dan Diberikan Ekstrak Kunyit

Kelompok Sampel	N	Rerata FSH (ng/ml) ± SD	p-value
Kontrol Negatif (KN)	5	57.43±20.96 ^a	0.018
Kontrol Positif (KP)	5	31.75±14.79 ^{bc}	
P1	5	50.03±10.31 ^a	
P2	5	38.10±7.48 ^{abc}	
P3	5	30.67±8.57 ^c	

Keterangan : Kontrol negatif (KN) diberikan 1 ml air suling saja; Kontrol positif (KP) dipapar aluminium dosis 100 mg/KgBB. Kelompok perlakuan 1 (P1) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB/hari. Kelompok perlakuan 2 (P2) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 200 mg/KgBB/hari. Kelompok perlakuan 3 (P3) dipapar aluminium 100 mg/KgBB dan diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 400 mg/KgBB/hari. Kolom rerata FSH±SD jika memuat huruf yang berbeda maka ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}<0.05$). Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Pada tabel 5.4 tertera kadar FSH serum pada kelompok yang terpapar aluminium 100 mg/KgBB (kontrol positif/KP) dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar aluminium (kontrol negatif/KN) mengalami penurunan, dengan nilai rerata 57.43±20.96 menjadi 31.75±14.79. Tampak bahwa penurunan kadar FSH tersebut ada perbedaan yang bermakna, hal ini menjelaskan bahwa paparan aluminium pada hewan coba tikus putih betina menyebabkan penurunan kadar FSH. Rerata kadar FSH pada pemberian ekstrak kunyit dengan dosis 1 di kelompok P1 (50.03±10.31) mengalami peningkatan bermakna jika dibandingkan dengan KP, P2 (38.10±7.48) menunjukkan adanya peningkatan namun tidak berbeda bermakna, sedangkan pada dosis 3 pada kelompok P3 (40.57±17.44) kadar FSH mengalami penurunan. Adapun dosis yang dianggap mampu meningkatkan kadar FSH pada tikus betina yang dipapar aluminium adalah dosis 1 yaitu 100 mg/kgBB/hari.

Selanjutnya rerata kadar FSH pada kelima kelompok tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram dibawah ini :



Gambar 5.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak kunyit dan Paparan aluminium terhadap kadar FSH

Keterangan : Kontrol positif (KP) lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol negatif (KN). Pada kelompok P1 memiliki rerata kadar FSH mendekati kelompok kontrol negatif. Adanya notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

5.4 Data Hasil Pengamatan Jumlah Folikel De Graaf dengan Pewarnaan Hematoxylin dan Eosin (HE) Pada Tikus Putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang Diberikan Ekstrak Kunyit dan Dipapar Aluminium

Pemeriksaan folikel *De Graaf* dilakukan pada preparat histologi yang sudah dilakukan pewarnaan *Hematoxylin* dan *Eosin* (HE). Penghitungan jumlah folikel *de graaf* menggunakan *software Olyvia* dari hasil dot slide scan dan berkonsultasi pada ahli Patologi Anatomi terlebih dahulu. Perhitungann folikel *de graaf* dilakukan secara manual pada seluruh penampang hasil *dot slide* ovarium.

Berikut akan disajikan dalam bentuk tabel dan histogram perbandingan rerata jumlah folike *de graaf* pada setiap kelompok tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) yang diberikan ekstrak kunyit dengan berbagai dosis dan dipapar aluminium klorida ($AlCl_3$) dengan dosis 100 mg/KgBB :

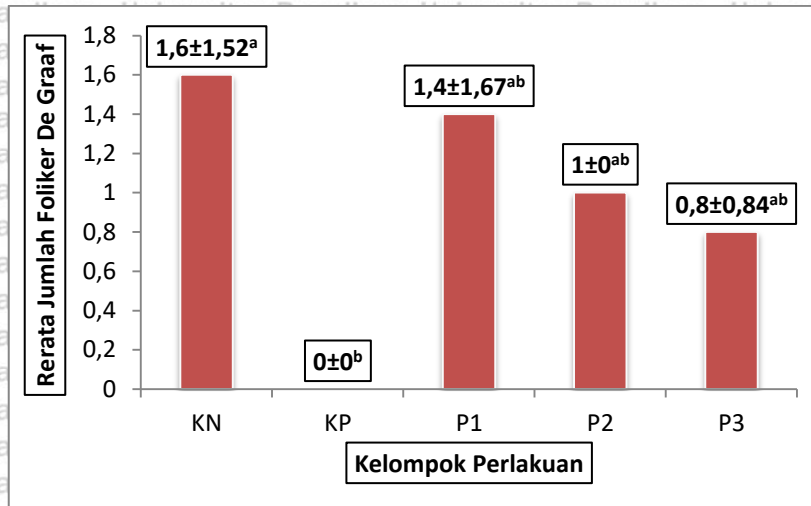
Tabel 5.5 Rerata Jumlah Folikel De Graaf Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium

Kelompok Sampel	Rerata Jumlah Folikel De Graaf ± SD	p-value
Kontrol Negatif (KN)	1,6±1,52 ^a	0,196
Kontrol Positif (KP)	0±0 ^b	
P1	1,4±1,67 ^{ab}	
P2	1±0 ^{ab}	
P3	0,8±0,84 ^{ab}	

Keterangan : Rerata jumlah folikel *de graaf* pada ovarium tikus betina yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negative (KN), kontrol positif (KP), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Jika *p-value* menunjukkan <0,05 maka menunjukkan perbedaan yang signifikan, dan jika *p*>0,05 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

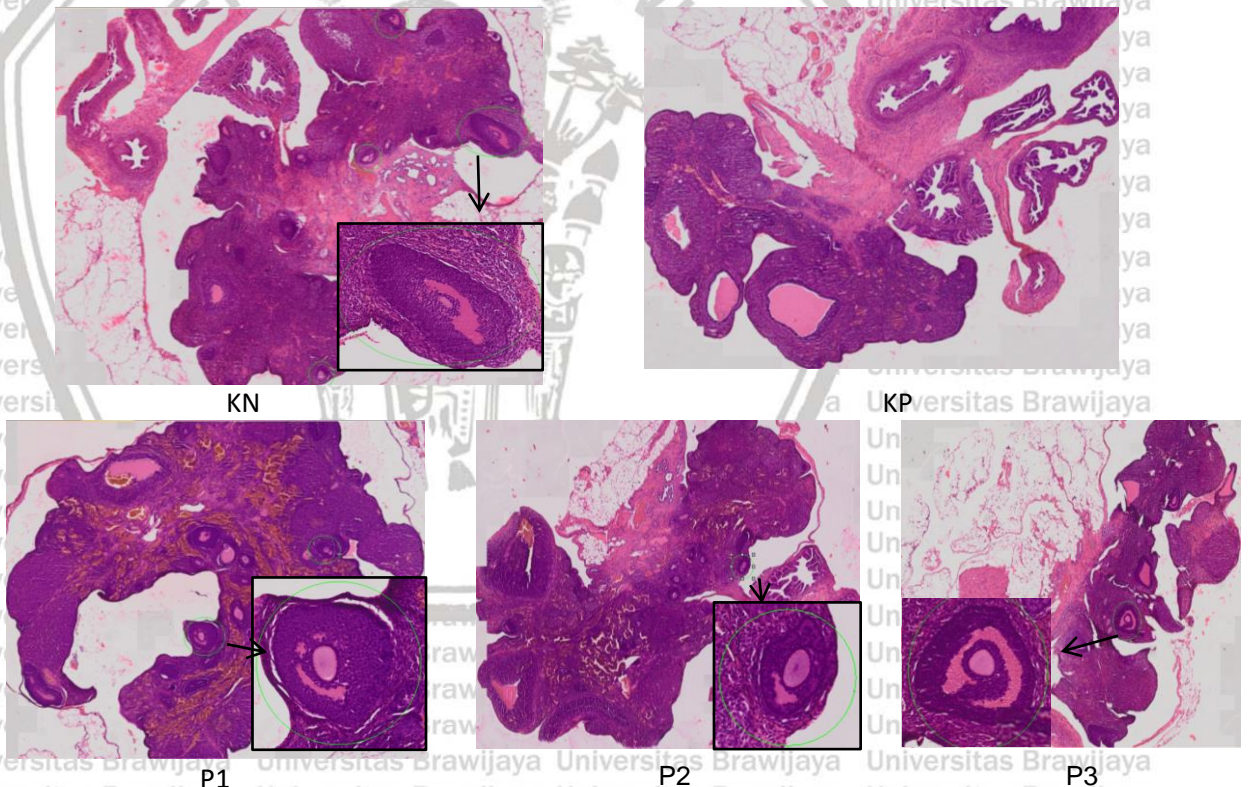
Pada tabel 5.5 tertera jumlah folikel *de graaf* pada kelompok yang terpapar aluminium 100 mg/KgBB (kontrol positif/KP) dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar aluminium (kontrol Negatif/KN) mengalami penurunan, dengan nilai rerata 1,6±1,52 menjadi 0±0. Tampak bahwa penurunan jumlah folikel *de graaf* tersebut bermakna, hal ini menunjukkan bahwa paparan aluminium pada hewan coba tikus putih betina menyebabkan penurunan jumlah folikel *de graaf*. Rerata jumlah folikel *de graaf* pada pemberian ekstrak kunyit dengan dosis 1 di kelompok P1 (1,4±1,67), dosis 2 pada kelompok P2 (1±0) dan dosis 3 di kelompok P3 (0,8±0,84) memperlihatkan peningkatan secara kuantitatif jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif namun tidak ada perbedaan bermakna. Akan tetapi, pada kelompok P3 mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2. Hasil uji statistik menunjukkan nilai 0,196 yang berarti rerata jumlah folikel *de graaf* menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Selanjutnya rerata folikel *de graaf* pada kelima kelompok tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram dibawah ini :



Gambar 5.4 Rerata Jumlah Folikel De Graaf Tikus Putih Betina yang diberikan Kunyit dan Dipapar Aluminium

Keterangan : Kontrol positif (KP) lebih rendah dibandingkan dengan Kontrol negative (KN). Pada kelompok P1,P2 dan memiliki rerata jumlah folikel de graaf mendekati kelompok kontrol negatif. Adanya notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.



Gambar 5.5 Jumlah Folikel de Graaf Pada Setiap Kelompok dengan Pewarnaan HE

Keterangan : Lingkaran Hijau menunjukkan Folikel De Graaf. Folikel de Graaf ditandai dengan korona radiata mengitari oosit yang menonjol kearah antrum (Gambar diambil pada pebesaran 400x)

5.5 Hasil Molecular Docking Kandungan Kunyit (*Curcuma longa*)

Molecular Docking adalah studi untuk menunjukkan potensi molekul obat berikatan dengan *protein pocket* dan interaksi ikatan hidrogennya. Dalam penelitian ini kami mengidentifikasi kunyit dapat mencegah infertilitas melalui jalur stres oksidatif, maka kami melihat melalui reseptor pada antioksidan seluler, neuroprotektif dan hormone reproduksi. Interaksi senyawa aktif kunyit yaitu kurkumin, demethoxycurcumin dan Bis-demethoxycurcumin dengan protein yang berperan sebagai antioksidan, neuroprotektif dan hormone reproduksi dapat digunakan untuk menghitung afinitas, energy dan aktivitas ikatan senyawa tersebut. Skor docking kurkumin tertera pada table 5.6.

Tabel 5.6 Skor Docking Kunyit (*Curcuma longa*)

Ligands	Receptor	Docking score (kcal mol ⁻¹)
kurkumin	SOD-1	-4.8
	CAT-3	-8.7
	AChE	-6.0
	BACE-1	-6.6
	COX-2	-5.4
	NMDA	-5.8
	AR	-10.7
	PR	-6.0
	CBG	-6.4
	SHBG	-6.7
Demethoxycurcumin	SOD-1	-5.7
	CAT-3	-8.9
	AChE	-5.9
	BACE-1	-6.5
	COX-2	-4.9
	NMDA	-6.2
	AR	-10.7
	PR	-6.1
	CBG	-6.6
	SHBG	-8.8
Bis-demethoxycurcumin	SOD-1	-5.9
	CAT-3	-7.6
	AChE	-4.4
	BACE-1	-6.8
	COX-2	-4.0
	NMDA	-5.3
	AR	-10.8
	PR	-5.3
	CBG	-5.1
	SHBG	-9.9

Keterangan : Kurkumin, demethoxycurcumin dan Bis-demethoxycurcumin merupakan senyawa aktif kunyit. Nilai negatif pada skor docking menunjukkan interaksi yang kuat antara ligan dengan protein

Interaksi yang berbeda terbentuk antara senyawa kurkumin, demethoxycurcumin dan bis-demethoxycurcumin dengan situs aktif. Nilai negatif pada skor docking menunjukkan interaksi yang kuat antara ligan dengan protein.

Pada reseptor antioksidan, SOD 1 dengan Bis-demethoxycurcumin dan CAT-3 dengan Demethoxycurcumin menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi (-5.9, -8.9 kkal/mol).

Pada reseptor neuroprotektif, Kurkumin menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi dengan AChE dan COX-2 (-6.0, -5.4 kkal/mol), Demethoxycurcumin menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi pada NMDA (-6.2 kkal/mol), sedangkan Bis-demethoxycurcumin menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi pada BACE-1. Pada table 5.7 dapat disimpulkan bahwa kunyit (*Curcuma longa*) memiliki efek neuroprotektif yang optimal melalui jalur pengikatan ligan Bis-demethoxycurcumin dengan BACE-1.

Pada hormone reproduksi, reseptor androgen reseptor (AR) dan Sex hormone binding globulin (SHBG) menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi dengan Bis-demethoxycurcumin (-10.8,-9.9 kkal/mol), sedangkan Demethoxycurcumin afinitas pengikatan tertinggi dengan reseptor PR dan CBG (masing-masing -6.1, -6.6 kkal/mol). Pada table 5.7 dapat disimpulkan bahwa interaksi utama kunyit (*Curcuma longa*) dengan hormone reproduksi melalui jalur pengikatan ligan Bis-demethoxycurcumin dan AR.

Adanya pengikatan dan nilai negatif pada skor docking menunjukkan kemungkinan interaksi yang kuat antara ligan dengan protein, sehingga mekanisme kerja dari kandungan senyawa di dalam kunyit yaitu kurkumin, demethoxycurcumin dan bis-demethoxycurcumin dapat berperan sebagai antioksidan, neuroprotektif dan berinteraksi dengan hormone reproduksi.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kunyit (*curcuma longa*) terhadap kadar SOD (*superoksida dismutase*) otak dan kadar FSH (*follicle stimulating hormone*) serum tikus putih betina (*rattus norvegicus*) yang dipapar aluminium. Temuan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kunyit tidak terbukti dapat mencegah penurunan kadar SOD otak, akan tetapi ekstrak kunyit pada dossi 100 mg/KgBB dapat mencegah penurunan FSH serum pada tikus betina yang dipapar aluminium.

6.1 Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap Kadar SOD Otak Tikus putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Aluminium

Menurut hasil penelitian yang tertera pada tabel 5.2 bahwa terjadi penurunan kadar SOD pada kelompok kontrol positif ($4,36 \pm 1,92$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($6,31 \pm 1,14$). Hal ini menjelaskan bahwa paparan aluminium 100 mg/KgBB/hari selama 30 hari menyebabkan penurunan kadar SOD otak tikus. Penelitian ini menegaskan studi sebelumnya bahwa paparan aluminium dapat menurunkan kadar SOD otak pada tikus, seperti dalam penelitian yang dilakukan oleh Nehru & Bhalla (2006), Shati *et al.*, (2011), Amjad & Umesalma (2015), Mathiyazahan *et al.*, (2015) dan Mesole *et al.*, (2020)

Aluminium dikenal sebagai agen neurotoksik yang kuat baik pada manusia dan hewan karena berinteraksi dengan enzim metabolik dalam berbagai mekanisme (Liaquat *et al.*, 2019). Efek toksik aluminium timbul dari aktivitas prooksidannya yang menimbulkan stres oksidatif dan peningkatan radikal bebas serta oksidasi protein dan lipid (Igbokwe *et al.*, 2019). Aluminium (Al^{3+}) dapat memasuki otak melintasi *Blood Brain Barrier* (BBB) secara endositosis yang dimediasi oleh reseptor transferrin (TfR) (Colomina & Peris-Sampedro, 2017).

Reaksi antara Al^{3+} dengan superoksida (O_2^-) menghasilkan senyawa AlO_2^{2+}

kemudian AlO_2^{2+} akan mengubah Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} , kompleks aluminium-superoksida dapat meningkatkan stres oksidatif di lingkungan biologis dengan bertindak sebagai agen pemicu reaksi fenton. Reaksi fenton merupakan reaksi antara Fe^{2+} dan hidrogen peroksida (H_2O_2), dalam reaksi ini diproduksi Fe^{3+} , Radikal hidroksil (OH^\cdot) dan ion hidroksil (OH^-). Radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi fenton merupakan bagian dari ROS yang akan menyebabkan peroksidasi lipid, merusak DNA dan protein (Yuan *et al.*, 2012; Kanti Das *et al.*, 2015).

Jaringan otak sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif dikarenakan tingginya tingkat konsumsi oksigen, adanya asam lemak tak jenuh ganda yang melimpah di membran sel (Yuan *et al.*, 2012). Produksi ROS yang diinduksi aluminium adalah mediator kerusakan pada otak. SOD sebagai enzim antioksidan endogen berperan memberikan pertahanan lini pertama melawan radikal bebas. Paparan aluminium dapat meningkatkan *Lipid Peroxidation* (LPO), dan peningkatan LPO diartikan sebagai penurunan SOD, CAT dan GPX sebagai enzim antioksidan endogen, dimana peningkatan LPO dan penurunan enzim antioksidan merupakan indikator stres oksidatif. (Han *et al.*, 2013; Amjad & Umesalma, 2015; Igboke *et al.*, 2019).

Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa studi terdahulu, yaitu studi yang dilakukan oleh Nehru & Bhalla (2006) pada tikus Sprague dawley betina yang diberikan aluminium klorida per oral 40 mg/KgBB/hari selama 8 minggu menimbulkan efek yang signifikan terhadap penurunan aktivitas SOD di empat wilayah otak dan yang paling signifikan adalah bagian hipotalamus. Kemudian, penelitian oleh Mathiyazhan *et al.*, (2015) pada tikus galur wistar yang diberikan AlCl_3 100 mg/KgBB selama 60 hari menurunkan kadar SOD otak. Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mesole *et al.*, (2020) pada

tikus galur wistar yang dipapar AlCl_3 per oral 100 mg/KgBB selama 21 hari diperoleh hasil secara signifikan menurunkan kadar SOD dan GPx otak.

Berdasarkan gambar 5.2 terlihat bahwa terjadi peningkatan kadar SOD pada kelompok P1 ($5,58 \pm 0,60$) yang diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB/hari dan kelompok P2 ($5,01 \pm 0,37$) dengan dosis ekstrak kunyit 200 mg/KgBB/hari apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif KP ($4,36 \pm 1,92$) namun peningkatan tersebut tidak bermakna. Akan tetapi rerata kadar SOD pada pemberian ekstrak kunyit dosis 3 di kelompok P3 ($3,57 \pm 1,54$) mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Salah satu kandungan aktif dari kunyit (*Curcuma longa*) adalah kurkumin. Kurkumin merupakan antioksidan yang kuat dan dapat berperan sebagai neuroprotektif. Pemberian kurkumin dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif, menurunkan produksi ROS dan menetralkan radikal bebas berbahaya seperti superoksida anion, radikal hidroksil dan oksida nitrat serta secara tidak langsung dapat menginduksi ekspresi protein antioksidan seperti SOD, CAT dan GPx (Samarghandian *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Yuliani *et al.*, 2019). Kurkumin memiliki kemampuan untuk melintasi *Blood Brain Barrier* (BBB) pada mamalia, sehingga dapat memberikan efek proteksi pada beberapa penyakit CNS dan neurodegeneratif (Dai *et al.*, 2018).

Penelitian yang dilakukan oleh Yuliani *et al.*, (2019) pada tikus spargue dawley untuk menyelidiki kemungkinan efek neuroprotektif dari ekstrak etanol kunyit terhadap stres oksidatif, tikus diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB, dan 300 mg/KgBB per oral selama 28 hari dengan hasil terjadi peningkatan rerata kadar SOD otak pada dosis 100 mg/KgBB dan 200 mg/KgBB.

Pada penelitian ini penurunan rerata kadar SOD pada dosis 3 (400 mg/KgBB/hari) di kelompok P3 bila dibandingkan kelompok kontrol positif diduga

karena efek paradoks dari kurkumin. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuliani *et al.*,(2019) pemberian 3 dosis ekstrak kunyit pada tikus spargue dawley dimana dosis tertinggi yaitu 300 mg/KgBB rerata kadar SOD otak menurun apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kurkumin memiliki efek paradoks, yang dapat bertindak sebagai antioksidan dan prooksidan tergantung pada konsentrasi dan lingkungan seluler. Aktivitas prooksidan tampaknya dimediasi oleh pembentukan radikal fenoksil kurkumin oleh sistem peroksidase-H₂O₂, yang mengoksidasi GSH atau NADH seluler untuk membentuk ROS. Apoptosis yang dimediasi kurkumin terkait erat dengan peningkatan ROS intraseluler. Dosis pasti kurkumin yang dapat menyebabkan efek pro-oksidatif masih harus dilakukan studi lebih lanjut (Yuliani *et al.*, 2019).

6.2 Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap Kadar FSH Serum Tikus putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Aluminium

Menurut hasil penelitian yang tertera pada tabel 5.4 bahwa terjadi penurunan kadar FSH serum pada kelompok kontrol positif (31.75±14.79) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (57.43±20.96). Hal ini menjelaskan bahwa paparan aluminium 100 mg/KgBB/hari selama 30 hari menyebabkan penurunan kadar FSH Serum. Penelitian ini sejalan dengan studi sebelumnya bahwa paparan aluminium dapat menurunkan kadar FSH serum pada tikus, seperti dalam penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.*, (2012), Akhigbe & Ige (2012) Pandey *et al.*,(2017) dan Sajjad *et al.*,(2020).

Reproduksi wanita diatur oleh beberapa hormon dan rentan terhadap paparan bahan kimia yang dapat mempengaruhi fungsi endokrin, salah satu gangguan pada reproduksi wanita yang disebabkan oleh EDC adalah gangguan produksi hormone melalui jalur hypothalamus-pituitary (Rattan *et al.*, 2017).

Aluminium dapat menjadi *endocrine disruptor* apabila digunakan secara terus menerus dan akan terjadi gangguan steroidogenesis apabila aluminium

mengendap di hipotalamus dan kelenjar pituitari (Miska-Schramm *et al.*, 2017; Gorgogietas *et al.*, 2018). Hipotalamus berfungsi mengontrol sintesis dan pelepasan *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang berperan pada hipofisis, merangsang pelepasan hormone *luteinizing Hormone* (LH) dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang bekerja pada ovarium dan testis, sebagai pemicu maturasi gonad, gametogenesis, dan steroidogenesis (Zhang, Li, *et al.*, 2016).

Paparan aluminium menginduksi stres oksidatif di otak yang mempengaruhi aktifitas enzim antioksidan endogen salah satunya SOD, dan penurunan yang paling signifikan adalah pada daerah hipotalamus (Nehru & Bhalla, 2006; Igbokwe *et al.*, 2019). Stres oksidatif yang meningkat dapat menyebabkan gangguan sintesis dan sekresi GnRH oleh hipotalamus, serta gangguan tersebut berdampak pada kegagalan hipofisis untuk melakukan sintesis dan sekresi FSH dan LH (Kardi, 2015). Selain itu, aluminium klorida ($AlCl_3$) dapat menghambat pelepasan ion Ca^{2+} , ion Ca^{2+} juga menyebabkan eksositosis GnRH, sehingga kerusakan sel yang terjadi mempengaruhi sekresi FSH dan LH. penurunan FSH dan LH juga diduga karena defisiensi kalsium terionisasi (Sajjad *et al.*, 2020).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Akhigbe & Ige (2012) pada tikus jantan galur wistar yang diberikan $AlCl_3$ 100 mg/KgBB/hari per oral selama 8 minggu dengan hasil terjadi penurunan yang signifikan terhadap kadar FSH. Diperkuat dengan penelitian lain yang dilakukan oleh Wang *et al.*, (2012) pada tikus betina galur wistar yang dipapar $AlCl_3$ dengan dosis 0, 64.18, 128.36 dan 256.72 mg/KgBB secara oral selama 120 hari dan hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar FSH menurun secara signifikan pada ketiga dosis aluminium dibandingkan dengan kelompok kontrol. Studi lain yang mendukung dilakukan oleh Sajjad *et al.*, (2020), pemaparan $AlCl_3$ dengan dosis

50 mg/KgBB secara oral selama 45 hari dengan hasil terjadi penurunan yang signifikan kadar FSH.

Berdasarkan gambar 5.3 terlihat bahwa terjadi peningkatan yang signifikan secara statistik kadar FSH pada kelompok P1 (57,43) yang diberikan ekstrak kunyit dengan dosis 100 mg/KgBB/hari dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (31,75). kelompok P2 (38,10) dengan dosis ekstrak kunyit 200 mg/KgBB/hari mengalami peningkatan namun tidak bermakna. Akan tetapi rerata kadar FSH pada pemberian ekstrak kunyit dosis 3 dikelompok P3 (30,67) mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Salah satu kandungan kunyit (*Curcuma longa*) adalah kurkumin. Kurkumin dan turunannya memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan atau pendegradasi radikal bebas dan memiliki struktur cincin aromatic dengan satu gugus hidroksi fenolik pada setiap cincinnya, gugus hidroksi fenolik ini berfungsi sebagai donor atom hydrogen pada radikal bebas yang tidak stabil menjadi lebih stabil (Suprihatin *et al.*, 2019). Selain itu, penelitian menunjukkan bahwa kurkumin memiliki efek stimulasi pada sistem reproduksi. Kurkumin dapat meningkatkan proliferasi dan menurunkan apoptosis serta memodulasi folikulogenesis dan steroidogenesis dalam sel ovarium (Bhardwaj *et al.*, 2020; Moreira-Pinto *et al.*, 2020). Pada penelitian ini, peningkatan kadar FSH serum diduga karena kurkumin yang terkandung didalam ekstrak kunyit, dapat mengurangi stres oksidatif di otak yang disebabkan oleh paparan aluminium dengan cara bertindak sebagai pembersih radikal bebas atau ROS dan memodulasi pembentukan antioksidan endogen, sehingga sintesis GnRH di hipotalamus tidak terganggu yang akan memodulasi sintesis dan sekresi FSH dan LH.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian terdahulu yaitu, Gad El-Hak & Mobarak (2020) melaporkan bahwa kurkumin dapat meningkatkan kadar antioksidan total testis dan meningkatkan kadar serum FSH pada tikus jantan.

Penelitian tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nahari & Eisa (2016) yang menyebutkan bahwa curcuma longa dapat memperbaiki efek yang disebabkan oleh paparan $AlCl_3$ yang mengakibatkan penurunan signifikan kadar FSH, LH dan testosterone plasma dengan cara meningkatkan kadar FSH, LH dan testosterone plasma sehingga mendekati level normalnya.

Potensi estrogenik dari fitoestrogen pada kunyit diduga dapat meningkatkan kadar estrogen dalam darah. Kandungan bubuk kunyit mirip dengan struktur kolesterol, dan berfungsi sebagai prekursor untuk sintesis hormone steroid seperti estrogen. Estrogen merupakan hormone steroid yang memiliki fungsi estrogenic dengan banyak jalur, salah satunya mempengaruhi sekresi hormone FSH dan LH melalui mekanisme umpan balik. Penambahan fitoestrogen dari luar tubuh (estrogen eksogen) akan menghalangi produksi *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) dari hipotalamus yang berdampak pada berkurangnya produksi hormone FSH dan LH dari hipofisis, kondisi ini akan mempertahankan sel-sel granulosa folikel untuk terus memproduksi estrogen (Suprihatin *et al.*, 2019). Penurunan kadar FSH serum pada kelompok P3 (30,67) dengan dosis ekstrak kunyit 400 mg/KgBB/hari diduga karena kandungan fitoestrogen yang semakin banyak dalam kunyit menyebabkan tingginya kadar estrogen dan memberikan efek umpan balik negatif pada sekresi FSH.

6.3 Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap Rerata Jumlah Folikel *De Graaf* Tikus putih Betina (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Aluminium

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna rerata jumlah folikel *de graaf* antara kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Rerata jumlah folikel *de graaf* pada kelompok kontrol positif lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, hal ini menunjukkan paparan aluminium dengan dosis 100 mg/KgBB/hari selama 30 hari dapat menurunkan jumlah folikel *de graaf*.

Toksitas aluminium dapat melalui berbagai cara sehingga berpengaruh pada gangguan folikulogenesis. Aluminium dapat menginduksi pembentukan ROS dan meningkatkan peroksidasi lipid serta menurunkan enzim antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif (Han *et al.*, 2013; Igbokwe *et al.*, 2019). Pengendapan aluminium di hipotalamus dan kelenjar pituitary dapat mengakibatkan gangguan steroidogenesis. Menurut penelitian terdahulu paparan aluminium telah terbukti dapat menurunkan kadar hormone FSH dan LH (Wang *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2014; Miska-Schramm *et al.*, 2017). Pada wanita, FSH menginduksi pertumbuhan dan pematangan folikel serta berkontribusi pada ovulasi (Lizneva *et al.*, 2019).

Jumlah folikel ovarium berhubungan dengan kadar FSH dan LH, dimana kedua hormone tersebut sebagai komponen utama HPO axis yang mengatur fungsi reproduksi. Penurunan LH dapat menurunkan ovulasi dan sekresi FSH, yang akan mengakibatkan perkembangan folikel ovarium yang tidak teratur, seperti atresia folikel, degenerasi dan rongga berbentuk gelembung (Fu *et al.*, 2014). Sehingga pada penelitian ini, penurunan jumlah folikel di kelompok kontrol positif diduga karena efek toksitas aluminium yang menyebabkan stres oksidatif dan mengakibatkan penurunan kadar FSH dan LH.

Hasil penelitian yang tertera pada tabel 5.5 menunjukkan rerata jumlah folikel de graaf pada pemberian ekstrak kunyit dengan dosis 1 di kelompok P1 ($1,4 \pm 1,67$), dosis 2 pada kelompok P2 (1 ± 0) dan dosis 3 di kelompok P3 ($0,8 \pm 0,84$) memperlihatkan peningkatan secara kuantitatif jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, akan tetapi peningkatan tersebut tidak bermakna. Kunyit mengandung kurkuminoid yang dapat berperan sebagai pembersih ROS, dan mencegah stres oksidatif dengan mendorong peningkatan regulasi antioksidan (Mosovska *et al.*, 2016). Selain itu, kurkumin dapat meningkatkan proliferasi dan menurunkan apoptosis serta memodulasi

folikulogenesis dan steroidogenesis dalam sel ovarium (Bhardwaj *et al.*, 2020; Moreira-Pinto *et al.*, 2020). Sehingga peningkatan rerata jumlah folikel dalam penelitian ini diduga karena kurkumin di dalam ekstrak kunyit memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menurunkan stres oksidatif yang diakibatkan oleh paparan aluminium serta memodulasi proses folikulogenesis.

6.4 Molecular Docking Kandungan Kunyit (*Curcuma longa*)

Pada table 5.6 menunjukkan bahwa kunyit (*Curcuma longa*) dapat menjadi antioksidan terbaik melalui jalur pengikatan ligan antara Demethoxycurcumin dengan CAT-3, dan kunyit memiliki efek neuroprotektif yang optimal melalui jalur pengikatan ligan Bis-demethoxycurcumin dengan BACE-1, serta interaksi utama dengan hormone reproduksi melalui jalur pengikatan ligan Bis-demethoxycurcumin dan AR.

Stres oksidatif sebagai salah satu faktor patologis untuk infertilitas. Tubuh memiliki pertahanan antioksidan endogen yaitu SOD, GPx dan CAT. SOD merupakan enzim detoksifikasi pertama untuk melindungi sel dari ROS yang memiliki peran memecah O_2^- menjadi H_2O_2 , selanjutnya CAT akan mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . (Fransen *et al.*, 2012; Bresciani *et al.*, 2015; Zhang, Bruins, *et al.*, 2016). Pada penelitian yang dilakukan oleh Reddy *et al.* (2016) aktivitas SOD, CAT, dan GSH berkurang pada kelompok infertile, dengan pemberian kurkumin memulihkan aktivitas enzim tersebut.

Gangguan metabolisme *amyloid precursor protein* (APP), suatu glikoprotein membrane integral di otak, yang melibatkan *β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* (BACE-1) mengakibatkan ketidakseimbangan produksi dengan degradasi (*Clearance*) beta amyloid (Ab) sehingga terjadi akumulasi Ab berlebihan yang bersifat neurotoksik dan memicu stres oksidatif (Devraj *et al.*, 2016). Stres oksidatif di otak mengganggu sintesis GnRH pada hipotalamus yang akan mempengaruhi reproduksi (Kardi, 2015). Kurkumin yang merupakan salah

satu kandungan dari kunyit memiliki efek neuroprotektif dengan cara menghambat aktivitas enzim BACE (Kumar *et al.*, 2019).

Peningkatan stres oksidatif mempengaruhi fungsi mitokondria pada oosit yang menghambat folikulogenesis dan mengakibatkan infertilitas (Agarwal *et al.*, 2012). Wanita dengan infertilitas menunjukkan penurunan kadar SHBG dan peningkatan kadar androgen (Mehrabian & Afghahi, 2013). Kurkumin telah terbukti dapat menurunkan ekspresi dari reseptor androgen (AR) dan meningkatkan degradasi AR (Rahman Siddique *et al.*, 2012).

6.5 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, yaitu :

1. Dalam penelitian ini peneliti tidak melakukan pemeriksaan kadar aluminium di otak dan darah sehingga tidak diketahui konsentrasi/kadar aluminium di dalam otak dan darah tikus
2. Peneliti tidak melakukan uji antioksidan pada ekstrak kunyit sehingga kandungan antioksidan ekstrak kunyit belum dapat dikonfirmasi dalam penelitian ini.

6.6 Implementasi dalam Asuhan Kebidanan

1. Hasil penelitian ini sebagai bahan untuk edukasi bidan kepada wanita usia subur (WUS) dan masyarakat mengenai bahaya paparan aluminium terhadap stres oksidatif di otak yang berpengaruh pada produksi hormon FSH, dan hal tersebut dapat mempengaruhi fungsi reproduksi wanita. Dimana kekurangan hormon FSH dapat menghambat proses folikulogenesis yang mengakibatkan infertilitas.

2. Hasil penelitian ini juga sebagai dasar teori untuk edukasi bidan pada WUS dan masyarakat mengenai manfaat ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dapat membantu menetralkan radikal bebas dan meningkatkan kadar FSH yang dapat mempengaruhi fungsi reproduksi wanita.

3. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar teori bahwa penggunaan antioksidan eksogen yang berasal dari kunyit (*Curcuma longa*) membutuhkan penelitian lebih lanjut agar didapatkan dosis antioksidan yang tepat dan tidak menyebabkan efek prooksidan.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) tidak terbukti mencegah penurunan kadar *Superoksida Dismutase* (SOD) otak tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium
2. Pemberian ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dengan dosis 100 mg/KgBB dapat mencegah penurunan kadar *ollicle Stimulating Hormone* (FSH) serum tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dipapar aluminium

7.2 Saran

1. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemeriksaan kadar aluminium dalam otak dan darah setelah diberikan paparan $AlCl_3$ untuk mengetahui kadar $AlCl_3$ dalam otak dan darah yang dapat menyebabkan kerusakan dan stres oksidatif.
2. Perlu dilakukan uji antioksidan pada ekstrak kunyit untuk mengetahui efektivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak kunyit dan uji toksistas untuk mengetahui dosis optimal ekstrak kunyit dalam mengatasi efek samping dari paparan aluminium.
3. Penelitian Selanjutnya sebaiknya lebih memperhatikan dalam penentuan dosis yang digunakan

DAFTAR PUSTAKA

- Abebe, M.S., Afework, M. & Abaynew, Y. (2020), "Primary and secondary infertility in Africa: systematic review with meta-analysis", *Fertility Research and Practice*, Springer, Vol. 6 No. 1, pp. 1–11.
- Abrahams, S., Haylett, W.L., Johnson, G., Carr, J.A. & Bardien, S. (2019), "Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative Stres: A review", *Neuroscience*, Elsevier, Vol. 406, pp. 1–21.
- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A. & Christiania, O. (2018), "Review on the role of glutathione on oxidative Stres and infertility", *JBRA Assisted Reproduction*, Brazilian Society of Assisted Reproduction, Vol. 22 No. 1, p. 61.
- Adityanti, D.C. (2018), *Hubungan Antara Pemberian Aluminium Dengan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar Jantan*, Universitas Jember.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A. & Gupta, S. (2012), "The effects of oxidative Stres on female reproduction: a review", *Reproductive Biology and Endocrinology 2012 10:1*, BioMed Central, Vol. 10 No. 1, pp. 1–31.
- Ahmad, R., Hussain, A. & Ahsan, H. (2019), "Peroxyntirite: cellular pathology and implications in autoimmunity", *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, Taylor & Francis, Vol. 40 No. 2, pp. 123–138.
- Ajayi, A.F. & Akhigbe, R.E. (2020), "Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update", *Fertility Research and Practice*, Springer Science and Business Media LLC, Vol. 6 No. 1, available at:<https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>.
- Ajibade, A.J., Kehinde, B.D., Atanda, A.A. & Adeleye, O.O. (2019), "Some Morphological and Biochemical Changes in the Kidney of Adult Wistar Rats Following Aluminium Chloride Exposures", *Asian Journal of Research in Nephrology*, Vol. 2, pp. 1–9.
- Akhigbe, R.E. & Ige, S.F. (2012), "The role of Allium cepa on aluminum-induced reproductive dysfunction in experimental male rat models", *Journal of Human Reproductive Sciences*, Wolters Kluwer -- Medknow Publications, Vol. 5 No. 2, pp. 200–205.
- Akomolafe, S.F. & Aluko, B.T. (2020), "Protective effect of curcumin on fertility in cyclophosphamide exposed rats: Involvement of multiple pathways", *Journal of Food Biochemistry*, Wiley Online Library, Vol. 44 No. 1, p. e13095.
- Amjad, S. & Umesalma, S. (2015), "Protective effect of Centella asiatica against aluminium-induced neurotoxicity in cerebral cortex, striatum, hypothalamus and hippocampus of rat brain-histopathological, and biochemical approach", *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, OMICS Publishing Group, Vol. 6 No. 1, p. 1.

Anacletus, F.C. & Onyegeme-Okerenta, B.M. (2016), "Evaluation of Aluminium Toxicity and the Ameliorative Effect of Some Selected Antioxidants on Reproductive Hormones and Organs of Female Wister Rats", *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, Maxwell Science Publishing, Vol. 7 No. 3, pp. 26–30.

Aritonang, T.R., Rahayu, S., Irmawaty Sirait, L., Br Karo, M., Peniel Simanjuntak, T., Natzir, R., Wardihan Sinrang, A., *et al.* (2017), "The Role of FSH, LH, Estradiol and Progesterone Hormone on Estrus Cycle of Female Rats", *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, Vol. 35 No. 1, pp. 92–100.

Azadmanesh, J. & Borgstahl, G.E.O. (2018), "A review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase", *Antioxidants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 7 No. 2, p. 25.

Bala, R., Singh, V., Rajender, S. & Singh, K. (2020), "Environment, Lifestyle, and Female Infertility", *Reproductive Sciences*, Springer, pp. 1–22.

Bao, X., Cao, Q., Xu, Y., Gao, Y., Xu, Y., Nie, X., Zhou, B., *et al.* (2015), "Synthesis and evaluation of a new Rhodamine B and Di (2-picoly) amine conjugate as a highly sensitive and selective chemosensor for Al³⁺ and its application in living-cell imaging", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Elsevier, Vol. 23 No. 4, pp. 694–702.

Barbieri, R.L. (2019), "Female infertility", *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*, Elsevier, pp. 556–581.

Benksim, A., Elkhoudri, N., Addi, R.A., Baali, A. & Cherkaoui, M. (2018), "Difference between primary and secondary infertility in Morocco: frequencies and associated factors", *International Journal of Fertility & Sterility*, Royan Institute, Vol. 12 No. 2, p. 142.

Beshay, V.E. & Carr, B.R. (2017), "Hypothalamic–Pituitary–Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle", *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, Springer International Publishing, pp. 1–17.

Bhardwaj, J.K., Panchal, H. & Saraf, P. (2020), "Ameliorating effects of natural antioxidant compounds on female infertility: a review", *Reproductive Sciences*, Springer, pp. 1–30.

Blair, J.A., McGee, H., Bhatta, S., Palm, R. & Casadesus, G. (2015), "Hypothalamic-pituitary-gonadal axis involvement in learning and memory and Alzheimer's disease: More than 'just' estrogen", *Frontiers in Endocrinology*, Frontiers Research Foundation, available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00045>.

Vander Borght, M. & Wyns, C. (2018), "Fertility and infertility: Definition and epidemiology", *Clinical Biochemistry*, Elsevier, Vol. 62, pp. 2–10.

Boudou, F., Bendahmane-Salmi, M., Benabderrahmane, M., Belakredar, A., Benalia, A. & Beghdadli, B. (2020), "Effect of Curcuma longa Aqueous Extract on Male Fertility in Aluminum Exposed Wistar Rats", *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, Vol. 10 No. 5, pp. 11–17.

Bousfield, G.R. & Harvey, D.J. (2019), "Follicle-stimulating hormone glycochemistry", *Endocrinology*, Endocrine Society, 1 June.

Bresciani, G., da Cruz, I.B.M. & Gonzalez-Gallego, J. (2015), "Manganese superoxide dismutase and oxidative Stress modulation", *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 68, Academic Press Inc., pp. 87–130.

Casarini, L. & Crepieux, P. (2019), "Molecular mechanisms of action of FSH", *Frontiers in Endocrinology*, Frontiers Media S.A., 14 May.

Chao, H., Zhang, X., Wang, W., Li, D., Ren, Y., Kang, J. & Liu, D. (2020), "Evaluation of carboxymethylpullulan- AlCl_3 as a coagulant for water treatment: A case study with kaolin", *Water Environment Research*, Wiley Online Library, Vol. 92 No. 2, pp. 302–309.

Christensen, A., Bentley, G., Cabrera, R., Ortega, H., Perfito, N., Wu, T. & Micevych, P. (2012), "Hormonal regulation of female reproduction", *Hormone and Metabolic Research*, Vol. 44 (8), pp. 587–591.

Colomina, M.T. & Peris-Sampedro, F. (2017), "Aluminum and Alzheimer's disease", *Neurotoxicity of Metals*, Springer, pp. 183–197.

Coss, D. (2020), "Commentary on the recent FSH collection: known knowns and known unknowns", *Endocrinology*, Oxford University Press US, Vol. 161 No. 1, p. bqz035.

Crisponi, G., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., Nurchi, V.M., Crespo-Alonso, M., Lachowicz, J.I., *et al.* (2013), "The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-related diseases", *Biomolecular Concepts*, De Gruyter, Vol. 4 No. 1, pp. 77–87.

Dai, W., Wang, H., Fang, J., Zhu, Y., Zhou, J., Wang, X., Zhou, Y., *et al.* (2018), "Curcumin provides neuroprotection in model of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE signaling pathway", *Brain Research Bulletin*, Elsevier, Vol. 140, pp. 65–71.

Das, N. & Kumar, T.R. (2018), "Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action", *Journal of Molecular Endocrinology*, BioScientifica Ltd., 1 April.

Davis, H.C. & Hackney, A.C. (2017), "The hypothalamic-pituitary-ovarian axis and oral contraceptives: Regulation and function", *Sex Hormones, Exercise and Women: Scientific and Clinical Aspects*, Springer International Publishing, pp. 1–17.

Desai, S.S., Roy, B.S. & Mahale, S.D. (2013), "REPRODUCTION REVIEW Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction", *Reproduction*, BioScientifica, Vol. 146 No. 6, pp. 146–235.

Desyasma, M. (2018), "Kajian potensi limbah sandblasting sebagai bahan baku koagulan (Studi kasus PT. Astra Otoparts divisi nusametal, Kelapa Gading, Jakarta Utara)", *SKRIPSI-2017*, Universitas Trisakti.

Devraj, K., Poznanovic, S., Spahn, C., Schwall, G., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Antonello, K., *et al.* (2016), "BACE-1 is expressed in the blood-brain barrier endothelium and is upregulated in a murine model of Alzheimer's disease", *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, SAGE Publications Sage UK: London, England, Vol. 36 No. 7, pp. 1281–1294.

Ding, R., Jin, Y., Liu, X., Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, T. & Xu, Y. (2016), "Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Elsevier, Vol. 796, pp. 46–53.

Dolara, P. (2014), "Occurrence, exposure, effects, recommended intake and possible dietary use of selected trace compounds (aluminium, bismuth, cobalt, gold, lithium, nickel, silver)", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Taylor & Francis, Vol. 65 No. 8, pp. 911–924.

Dordevic, D., Buchtova, H., Jancikova, S., Macharackova, B., Jarosova, M., Vitez, T. & Kushkevych, I. (2019), "Aluminum contamination of food during culinary preparation: Case study with aluminum foil and consumers' preferences", *Food Science & Nutrition*, Wiley Online Library, Vol. 7 No. 10, pp. 3349–3360.

Drazba, D. (2019), *Long-Term Effects of Aluminium on Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection in Experimental Mice Brain*, Lithuanian University.

Dutta, S. & Sengupta, P. (2016), "Men and mice: Relating their ages", *Life Sciences*, Vol. 152, pp. 244–248.

El-Hak, H.N.G. & Mobarak, Y.M. (2020), "Copper oxychloride-induced testicular damage of adult albino rats and the possible role of curcumin in healing the damage", *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, pp. 1–14.

Elhoussein, O.G., Ahmed, M.A., Suliman, S.O. & Adam, I. (2019), "Epidemiology of infertility and characteristics of infertile couples requesting assisted reproduction in a low-resource setting in Africa, Sudan", *Fertility Research and Practice*, BioMed Central, Vol. 5 No. 1, p. 7.

Exley, C. (2013), "Human exposure to aluminium", *Environmental Science: Processes & Impacts*, Royal Society of Chemistry, Vol. 15 No. 10, pp. 1807–1816.

Exley, C. (2016), "The toxicity of aluminium in humans", *Morphologie*, Elsevier, Vol. 100 No. 329, pp. 51–55.

Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B. & Apanasets, O. (2012), "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, Vol. 1822 No. 9, pp. 1363–1373.

Fu, Y., Jia, F.B., Wang, J., Song, M., Liu, S.M., Li, Y.F., Liu, S.Z., *et al.* (2014), "Effects of sub-chronic aluminum chloride exposure on rat ovaries", *Life Sciences*, Elsevier, Vol. 100 No. 1, pp. 61–66.

- Garcia, T., Esparza, J.L., Giralt, M., Romeu, M., Domingo, J.L. & Gómez, M. (2010), "Protective role of melatonin on oxidative Stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of a β pp transgenic mice after chronic exposure to aluminum", *Biological Trace Element Research*, Springer, Vol. 135 No. 1–3, pp. 220–232.
- Giorgio, M. (2015), "Oxidative Stress and the unfulfilled promises of antioxidant agents", *Ecancermedicalscience*, ecancer Global Foundation, Vol. 9.
- Gonzalez-Gallego, J., Victoria García-Mediavilla, M., Sánchez-Campos, S. & Tuñón, M.J. (2010), "Fruit polyphenols, immunity and inflammation", *Cambridge.Org*, available at: <https://doi.org/10.1017/S0007114510003910>.
- Gorgogietas, V.A., Tsialtas, I., Sotiriou, N., Laschou, V.C., Karra, A.G., Leonidas, D.D., Chrousos, G.P., et al. (2018), "Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signaling in breast cancer cells", *Journal of Molecular Biochemistry*, NIH Public Access, Vol. 7 No. 1, p. 1.
- Grebler, S. & Fries, R. (2014), "Aluminium-Toxikologie und gesundheitliche Aspekte körpernaher Anwendungen", *Bundesministerium Fur Gesundheit. Sektion II. Wien*, p. 156.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2015), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, USA.
- Han, S., Lemire, J., Appanna, V.P., Auger, C., Castonguay, Z. & Appanna, V.D. (2013), "How aluminum, an intracellular ROS generator promotes hepatic and neurological diseases: the metabolic tale", *Cell Biology and Toxicology*, Springer, Vol. 29 No. 2, pp. 75–84.
- Hanafiah, K.A. (2012), "Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi Edisi Ke-3", *Rajawali Perss. Jakarta*.
- Hardisson, A., Revert, C., González-Weller, D., Gutiérrez, A., Paz, S. & Rubio, C. (2017), "Aluminium exposure through the diet", *Journal of Food Science Nutrition*, Vol. 3, p. 19.
- Hart, R.J. (2016), "Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics", *Physiological Reviews*, American Physiological Society Bethesda, MD, Vol. 96 No. 3, pp. 873–909.
- Harzif, A.K., Santawi, V.P.A. & Wijaya, S. (2019), "Discrepancy in perception of infertility and attitude towards treatment options: Indonesian urban and rural area", *Reproductive Health*, Springer, Vol. 16 No. 1, p. 126.
- Hau, J. & Scharpiro, S.J. (2013), *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume III: Animal Models*, CRC Press.
- Hedrich, H.J. (2020), "Taxonomy and stocks and strains", *The Laboratory Rat*, Elsevier, pp. 47–75.
- Hegazi, M.A.M. & Elebshany, I.A.K. (2019), "Ameliorative effect of Moringa oleifera on oxidative Stress in male albino rat brain promoted by aluminium exposure", *Nature and Science*, Vol. 17(2), pp. 92–100.

Helmholtz, O., Keith Hudson, L., Misra, C., Wefers, K., Heck, W., Stark, H., Danner, M., et al. (2007), "Aluminum Compounds, Inorganic", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, available at: https://doi.org/10.1002/14356007.a01_527.pub2.

Hewlings, S.J. & Kalman, D.S. (2017), "Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health", *MDPI Journal*, Vol. 6 (10), pp. 1–11.

Heydel, J.-M., Holsztynska, E.J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y. & Bon, A.-M. Le. (2010), "UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function", *Drug Metabolism Reviews*, Taylor & Francis, Vol. 42 No. 1, pp. 74–97.

Huang, W., Zhang, X.I.A. & Chen, W. (2016), "Role of oxidative Stress in Alzheimer's disease", *Biomedical Reports*, Spandidos Publications, Vol. 4 No. 5, pp. 519–522.

Hwang, K.-A. & Choi, K.-C. (2015), "Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenicity Posing the Risk of Cancer Progression in Estrogen-Responsive Organs", *Advances in Molecular Toxicology*, Vol. 9, Elsevier, pp. 1–33.

Igbokwe, I.O., Igwenagu, E. & Igbokwe, N.A. (2019), "Aluminium toxicosis: a review of toxic actions and effects", *Interdisciplinary Toxicology*, Sciendo, Vol. 12 No. 2, pp. 45–70.

Ighodaro, O.M. & Akinloye, O.A. (2018), "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid", *Alexandria Journal of Medicine*, Taylor & Francis, Vol. 54 No. 4, pp. 287–293.

Kanti Das, T., Wati, M.R. & Fatima-Shad, K. (2015), "Oxidative Stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease", *Archives of Neuroscience*, Kowsar, Vol. 2 No. 2.

Kardi. (2015), *Pemberian Glutathion Pada Mencit Jantan Dewasa Yang Terpapar Asap Rokok Dapat Meningkatkan Motilitas Progresif Spermatozoa*, Universitas Udayana.

Kawahara, M. & Kato-Negishi, M. (2011), "Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses", *International Journal of Alzheimer's Disease*, Hindawi, Vol. 2011.

Kim, J.-S., Kim, H., Yim, B., Rhee, J.-S., Won, E.-J. & Lee, Y.-M. (2018), "Identification and molecular characterization of two Cu/Zn-SODs and Mn-SOD in the marine ciliate *Euplotes crassus*: modulation of enzyme activity and transcripts in response to copper and cadmium", *Aquatic Toxicology*, Elsevier, Vol. 199, pp. 296–304.

Klotz, K., Weistenhöfer, W., Neff, F., Hartwig, A., van Thriel, C. & Drexler, H. (2017), "The health effects of aluminum exposure", *Deutsches Ärzteblatt International*, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Vol. 114 No. 39, p. 653.

Kocaadam, B. & Sanlier, N. (2017), "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Taylor & Francis, Vol. 57 No. 13, pp. 2889–2895.

Krupinska, I. (2020), "Aluminium drinking water treatment residuals and their toxic impact on human health", *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 25 No. 3, p. 641.

Kumar, A., Pandey, R. & Sharma, B. (2020), "Modulation of Superoxide Dismutase Activity by Mercury, Lead, and Arsenic", *Biological Trace Element Research*, Springer, pp. 1–8.

Kumar, A., Srivastava, G., Negi, A.S. & Sharma, A. (2019), "Docking, molecular dynamics, binding energy-MM-PBSA studies of naphthofuran derivatives to identify potential dual inhibitors against BACE-1 and GSK-3 β ", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Taylor & Francis, Vol. 37 No. 2, pp. 275–290.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. & Aster, J.C. (2014), *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition e-Book*, Elsevier health sciences.

Kumar, V. & Gill, K.D. (2014), "Oxidative Stres and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: a review", *Neurotoxicology*, Elsevier, Vol. 41, pp. 154–166.

Leao, R.B.F. & Esteves, S.C. (2014), "Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech", *Clinics*, SciELO Brasil, Vol. 69 No. 4, pp. 279–293.

Lee, S., Min, J. & Min, K. (2020), "Female Infertility Associated with Blood Lead and Cadmium Levels", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 17 No. 5, p. 1794.

León-González, A.J., Auger, C. & Schini-Kerth, V.B. (2015), "Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy", *Biochemical Pharmacology*, Elsevier, Vol. 98 No. 3, pp. 371–380.

Liaquat, L., Sadir, S., Batool, Z., Tabassum, S., Shahzad, S., Afzal, A. & Haider, S. (2019), "Acute aluminum chloride toxicity revisited: Study on DNA damage and histopathological, biochemical and neurochemical alterations in rat brain", *Life Sciences*, Elsevier, Vol. 217, pp. 202–211.

Linardaki, Z.I., Orkoulas, M.G., Kokkosis, A.G., Lamari, F.N. & Margaritis, M. (2013), "Investigation of the neuroprotective action of saffron (*Crocus sativus* L.) in aluminum-exposed adult mice through behavioral and neurobiochemical assessment", *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier, Vol. 52, pp. 163–170.

Liu, H., He, J., Chi, C. & Gu, Y. (2015), "Identification and analysis of icCu/Zn-SOD, Mn-SOD and ecCu/Zn-SOD in superoxide dismutase multigene family of *Pseudosciaena crocea*", *Fish & Shellfish Immunology*, Elsevier, Vol. 43 No. 2, pp. 491–501.

Lizneva, D., Rahimova, A., Kim, S.M., Atabiekov, I., Javaid, S., Alamoush, B., Taneja, C., et al. (2019), "FSH beyond fertility", *Frontiers in Endocrinology*, Frontiers Media S.A., 19 March.

Martha, E., Furny, E.F., Hudyono, J. & Tandean, M. (2016), "Pengaruh Curcumin sebagai Inhibitor Jalur Janus Kinase-STAT 3 pada Arthritis Reumatoid", *Cermin Dunia Kedokteran*, Vol. 43 No. 11, pp. 863–866.

Martins, A.D., Selvam, M.K.P., Agarwal, A., Alves, M.G. & Baskaran, S. (2020), "Alterations in seminal plasma proteomic profile in men with primary and secondary infertility", *Scientific Reports*, Nature Publishing Group, Vol. 10 No. 1, pp. 1–15.

Masoumi, S.Z., Parsa, P., Darvish, N., Mokhtari, S., Yavangi, M. & Roshanaei, G. (2015), "An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan", *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Vol. 13 No. 8, p. 513.

Mathiyazahan, D.B., Thenmozhi, A.J. & Manivasagam, T. (2015), "Protective effect of black tea extract against aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats: A behavioural, biochemical and molecular approach", *Journal of Functional Foods*, Elsevier, Vol. 16, pp. 423–435.

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. Das & Goli, D. (2016), "Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS, 1 October.

Maynard, R.L. & Downes, N. (2019), *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*, Academic Press.

McDonald, R., Sadler, C. & Kumar, T.R. (2019), "Gain-of-Function Genetic Models to Study FSH Action", *Frontiers in Endocrinology*, Frontiers, Vol. 10, p. 28.

Mehrabian, F. & Afghahi, M. (2013), "Can sex-hormone binding globulin considered as a predictor of response to pharmacological treatment in women with polycystic ovary syndrome?", *International Journal of Preventive Medicine*, Wolters Kluwer -- Medknow Publications, Vol. 4 No. 10, pp. 1169–1174.

Mesole, S.B., Alfred, O.O., Yusuf, U.A., Lukubi, L. & Ndhlovu, D. (2020), "Apoptotic inducement of neuronal cells by aluminium chloride and the neuroprotective effect of eugenol in wistar rats", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Hindawi, Vol. 2020.

Mikhael, S., Punjala-Patel, A. & Gavriloja-Jordan, L. (2019), "Hypothalamic-pituitary-ovarian axis disorders impacting female fertility", *Biomedicines*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 7 No. 1, p. 5.

Miska-Schramm, A., Kapusta, J. & Kruczek, M. (2017), "The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*)", *Biological Trace Element Research*, Springer, Vol. 177 No. 1, pp. 97–106.

Moghadam, A.R., Tutunchi, S., Namvaran-Abbas-Abad, A., Yazdi, M., Bonyadi, F., Mohajeri, D., Mazani, M., *et al.* (2015), "Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative Stress", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, BioMed Central, Vol. 15 No. 1, pp. 1–13.

Mohebbati, R., Anaiegoudari, A. & Khazdair, M.R. (2017), "The effects of Curcuma longa and curcumin on reproductive systems", *Endocrine Regulations*, Sciendo, Vol. 51 No. 4, pp. 220–228.

Mondola, P., Damiano, S., Sasso, A. & Santillo, M. (2016), "The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme", *Frontiers in Physiology*, Frontiers Media S.A., Vol. 7 No. NOV, p. 594.

Moneim, A.E.A. (2012), "Evaluating the potential role of pomegranate peel in aluminum-induced oxidative Stress and histopathological alterations in brain of female rats", *Biological Trace Element Research*, Springer, Vol. 150 No. 1–3, pp. 328–336.

Moreira-Pinto, B., Costa, L., Fonseca, B.M. & Rebelo, I. (2020), "Dissimilar effects of curcumin on human granulosa cells: Beyond its anti-oxidative role", *Reproductive Toxicology*, Elsevier, Vol. 95, pp. 51–58.

Mosovska, S., Petakova, P., Kalinak, M. & Mikulajova, A. (2016), "Antioxidant properties of curcuminoids isolated from Curcuma longa L.", *Acta Chimica Slovaca*, Sciendo, Vol. 9 No. 2, pp. 130–135.

Mowry, J.B., Spyker, D.A., Brooks, D.E., Zimmerman, A. & Schauben, J.L. (2016), "2015 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 33rd Annual Report", *Clinical Toxicology*, Taylor & Francis, Vol. 54 No. 10, pp. 924–1109.

Naftolin, F., Khafaga, A. & Nachtigall, M. (2019), "The Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Regulation of the Menstrual Cycle", pp. 1–13.

Nahari, H. Al & Eisa, R. Al. (2016), "Effect of turmeric (Curcuma longa) on some pituitary, thyroid and testosterone hormone against aluminum chloride (Al [Cl. sub. 3]) induced toxicity in rat", *Advances in Environmental Biology*, American-Eurasian Network for Scientific Information, Vol. 10 No. 4, pp. 250–262.

Nair, K.P. (2019), *Turmeric (Curcuma Longa L.) and Ginger (Zingiber Officinale Rosc.)-World's Invaluable Medicinal Spices: The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger*, Springer Nature.

National Collaborating Centre for women's and children's Health (UK). (2013), *Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems*, Royal College of Obstetricians & Gynaecologists.

Nehru, B. & Anand, P. (2005), "Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 19 No. 2–3, pp. 203–208.

Nehru, B. & Bhalla, P. (2006), "Aluminium-induced imbalance in oxidant and antioxidant determinants in brain regions of female rats: Protection by centrophenoxine", *Toxicology Mechanisms and Methods*, Vol. 16 No. 1, pp. 21–25.

Newairy, A.-S.A., Salama, A.F., Hussien, H.M. & Yousef, M.I. (2009), "Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats", *Food and Chemical Toxicology*, Elsevier, Vol. 47 No. 6, pp. 1093–1098.

Niu, Q. (2018), "Overview of the relationship between aluminum exposure and health of human being", *Neurotoxicity of Aluminum*, Springer, pp. 1–31.

Nugroho, S.W., Fauziah, K.R., Sajuthi, D. & Darusman, H.S. (2018), "Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar dan Sprague-Dawley", *Acta VETERINARIA Indonesiana*, Vol. 6 No. 2, pp. 32–37.

Okanlawon, E., Bello, K., Akinola, O.S., Irekhore, O.T. & Ademolue, R.O. (2020), "Evaluation Of Growth, Reproductive Performance and Economic benefits Of Rabbits Fed Diets Supplemented With Turmeric (*Curcuma Longa*) Powder", *Egyptian Poultry Science Journal*, The Egyptian Poultry Science Association, Vol. 40 No. 3, pp. 701–714.

Omosa, L.K., Midiwo, J.O. & Kuete, V. (2017), "Curcuma longa", *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, Elsevier, pp. 425–435.

Osama, A., Fatma, A., Mohamed, E.-B. & Huda, S. (2014), *AVAS Annals of Veterinary and Animal Science Studies on the Protective Effects of Ginger Extract and in Combination with Ascorbic Acid against Aluminum Toxicity Induced Hematological Disorders, Oxidative Stres and Hepatorenal Damage in Rats*, *Annals of Veterinary and Animal Science*, available at: www.naturepub.org (accessed 22 January 2021).

Paccola, C.C., Resende, C.G., Stumpp, T., Miraglia, S.M. & Cipriano, I. (2018), *The Rat Estrous Cycle Revisited: A Quantitative and Qualitative Analysis*, *Animal Reproduction (AR)*, Vol. 10(4).

Pandey, G., Jain, G.C. & Jain, G.C. (2017), *Aluminium Chloride-Induced Testicular Effects in Rats: A Histomorphometrical Study Antifertility View Project Aluminium Chloride-Induced Testicular Effects in Rats: A Histomorphometrical Study*, *Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST)*, Vol. 1, available at: www.ajast.net (accessed 20 January 2021).

Patel, M. (2016), "Targeting oxidative Stres in central nervous system disorders", *Trends in Pharmacological Sciences*, Elsevier, Vol. 37 No. 9, pp. 768–778.

Pham-Huy, L.A., He, H. & Pham-Huy, C. (2008), "Free radicals, antioxidants in disease and health", *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, Master Publishing Group, Vol. 4 No. 2, p. 89.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B. & Periyasamy, L. (2015), "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Springer, Vol. 30 No. 1, pp. 11–26.

Pisoschi, A.M. & Pop, A. (2015), "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative Stres: A review", *European Journal of Medicinal Chemistry*, Elsevier, Vol. 97, pp. 55–74.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., et al. (2017), "Oxidative Stres: harms and benefits for human health", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Hindawi, Vol. 2017.

Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J. & Valko, M. (2017), "Targeting free radicals in oxidative Stres-related human diseases", *Trends in Pharmacological Sciences*, Elsevier, Vol. 38 No. 7, pp. 592–607.

Rahman Siddique, H., Nanda, S., Parray, A. & Saleem, M. (2012), "Androgen Receptor in Human Health: A Potential Therapeutic Target", *Current Drug Targets*, Bentham Science Publishers Ltd., Vol. 13 No. 14, pp. 1907–1916.

Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E. & Flaws, J.A. (2017), "Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility", *Journal of Endocrinology*, Bioscientifica Ltd, Vol. 233 No. 3, pp. R109–R129.

Reddy, P.S., Begum, N., Mutha, S. & Bakshi, V. (2016), "Beneficial effect of Curcumin in Letrozole induced polycystic ovary syndrome", *Asian Pacific Journal of Reproduction*, Elsevier (Singapore) Pte Ltd, Vol. 5 No. 2, pp. 116–122.

Rezaee, M., Yamini, Y., Khanchi, A., Faraji, M. & Saleh, A. (2010), "A simple and rapid new dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with inductively coupled plasma–optical emission spectrometry for preconcentration and determination of aluminium in water samples", *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, Vol. 178 No. 1–3, pp. 766–770.

RI, K. (2016), "Peraturan Menteri kesehatan Republik Indonesia Nomor 70 Tahun 2016 Tentang Standar dan Persyaratan kesehatan Lingkungan Kerja Industri", pp. 1–195.

Sahebkar, A., Serban, M.-C., Ursoniu, S. & Banach, M. (2015), "Effect of curcuminoids on oxidative Stres: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *Journal of Functional Foods*, Elsevier, Vol. 18, pp. 898–909.

Sajjad, S., Saeed, L., Malik, H., Farooq, U., Akhtar, S. & Akhtar, S. (2020), "Ethanol extract of propolis and vitamin E attenuates metal-induced testicular necrosis: time-related study on male reproductive system in albino mice", *The European Zoological Journal*, Taylor and Francis Ltd., Vol. 87 No. 1, pp. 138–147.

Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T. & Samini, F. (2017), "Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative Stres in rat brain, liver and kidney", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Elsevier, Vol. 87, pp. 223–229.

Sanchez-Iglesias, S., Mendez-Alvarez, E., Iglesias-Gonzalez, J., Munoz-Patino, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J.L. & Soto-Otero, R. (2009), "Brain oxidative Stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease", *Journal of Neurochemistry*, Wiley Online Library, Vol. 109 No. 3, pp. 879–888.

Schieber, M. & Chandel, N.S. (2014), "ROS function in redox signaling and oxidative Stress", *Current Biology*, Elsevier, Vol. 24 No. 10, pp. R453–R462.

Sengupta, P. (2013), "The laboratory rat: relating its age with human's", *International Journal of Preventive Medicine*, Wolters Kluwer--Medknow Publications, Vol. 4 No. 6, p. 624.

Sengupta, P., Banerjee, R., Nath, S., Das, S. & Banerjee, S. (2015), "Metals and female reproductive toxicity", *Human & Experimental Toxicology*, SAGE Publications Sage UK: London, England, Vol. 34 No. 7, pp. 679–697.

Sharif, Z.I.M., Subuki, I., Zaki, N.A.M., Mustapha, F.A., Yusof, N.M. & Jai, J. (2019), "Turmeric (*Curcuma longa* L.) oil as antioxidant agent in starch-based edible coating film for fresh-cut fruits", *Chron. Complement. Altern. Integr. Med*, Vol. 1.

Sharma, D.R., Sunkaria, A., Wani, W.Y., Sharma, R.K., Verma, D., Priyanka, K., Bal, A., *et al.* (2015), "Quercetin protects against aluminium induced oxidative Stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the PGC-1 α signaling pathway", *Neurotoxicology*, Elsevier, Vol. 51, pp. 116–137.

Shati, A.A., Elsaid, F.G. & Hafez, E.E. (2011), "Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of *Crocus sativus* L. extraction and honey syrup", *Neuroscience*, Vol. 175, pp. 66–74.

Sies, H. (2020), "Oxidative Stress: Concept and some practical aspects", *Antioxidants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 9 No. 9, p. 852.

Singla, N. & Dhawan, D.K. (2013), "Zinc, a neuroprotective agent against aluminum-induced oxidative DNA injury", *Molecular Neurobiology*, Springer, Vol. 48 No. 1, pp. 1–12.

Sirisidthi, K., Kosai, P., Jiraungkoorskul, K. & Jiraungkoorskul, W. (2016), "Antithrombotic activity of turmeric (*Curcuma longa*): A review.", *Indian Journal of Agricultural Research*, Vol. 50 No. 2.

Sjogren, B., Iregren, A., Montelius, J. & Yokel, R.A. (2015), "Aluminum", *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, pp. 549–564.

Smitz, J., Wolfenson, C., Chappel, S. & Ruman, J. (2015), "Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility", *Reproductive Sciences*, SAGE Publications Inc.

Stahl, T., Falk, S., Taschan, H., Boschek, B. & Brunn, H. (2018), "Evaluation of human exposure to aluminum from food and food contact materials", *European Food Research and Technology*, Springer, Vol. 244 No. 12, pp. 2077–2084.

Stamatiades, G.A., Carroll, R.S. & Kaiser, U.B. (2019), "GnRH—a key regulator of FSH", *Endocrinology*, Endocrine Society Washington, DC, Vol. 160 No. 1, pp. 57–67.

Steller, J.G., Alberts, J.R. & Ronca, A.E. (2018), "Oxidative Stress as cause, consequence, or biomarker of altered female reproduction and development in the space environment", *International Journal of Molecular Sciences*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 19 No. 12, p. 3729.

Sumathi, T., Shobana, C., Thangarajeswari, M. & Usha, R. (2015), "Protective effect of L-theanine against aluminium induced neurotoxicity in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of rat brain—histopathological, and biochemical approach", *Drug and Chemical Toxicology*, Taylor & Francis, Vol. 38 No. 1, pp. 22–31.

Sun, H., Gong, T.-T., Jiang, Y.-T., Zhang, S., Zhao, Y.-H. & Wu, Q.-J. (2019), "Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017", *Aging (Albany NY)*, Impact Journals, LLC, Vol. 11 No. 23, p. 10952.

Suprihatin, T., Widyarti, S., Rifa, M. & Rahayu, S. (2019), "Malondialdehyde (MDA) Ovary and Estradiol Blood Serum Levels of Premenopause White Rat (*Rattus norvegicus*) after Turmeric Powder (*Curcuma longa* L.) Treatment", *JOURNAL OF TROPICAL LIFE SCIENCE*, Vol. 9 No. 3, pp. 237–242.

Tan, D.-X., Manchester, L.C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z. & Reiter, R.J. (2015), "Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism", *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, Vol. 20 No. 10, pp. 18886–18906.

Tanvir, E.M., Hossen, M., Hossain, M., Afroz, R., Gan, S.H., Khalil, M. & Karim, N. (2017), "Antioxidant properties of popular turmeric (*Curcuma longa*) varieties from Bangladesh", *Journal of Food Quality*, Hindawi, Vol. 2017.

Tietz, T., Lenzner, A., Kolbaum, A.E., Zellmer, S., Riebeling, C., Gürtler, R., Jung, C., *et al.* (2019), "Aggregated aluminium exposure: risk assessment for the general population", *Archives of Toxicology*, Springer, pp. 1–19.

Vanduy, N., Settivari, R., LeVora, J., Zhou, S., Urine, J. & Nass, R. (2013), "The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration", *Journal of Neurochemistry*, Wiley Online Library, Vol. 124 No. 1, pp. 147–157.

Viezelienė, D., Beekhof, P., Gremmer, E., Rodovicius, H., Sadauskiene, I., Jansen, E. & Ivanov, L. (2013), "Selective induction of IL-6 by aluminum-induced oxidative stress can be prevented by selenium", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Elsevier, Vol. 27 No. 3, pp. 226–229.

Vignal, C., Desreumaux, P. & Body-Malapel, M. (2016), "Gut: An underestimated target organ for Aluminum", *Morphologie*, Elsevier, Vol. 100 No. 329, pp. 75–84.

Wang, N., She, Y., Zhu, Y., Zhao, H., Shao, B., Sun, H., Hu, C., et al. (2012), "Effects of subchronic aluminum exposure on the reproductive function in female rats", *Biological Trace Element Research*, Springer, Vol. 145 No. 3, pp. 382–387.

Wang, Y.-L., Ju, B., Zhang, Y.-Z., Yin, H.-L., Liu, Y.-J., Wang, S.-S., Zeng, Z.-L., et al. (2017), "Protective effect of curcumin against oxidative Stress-induced injury in rats with Parkinson's disease through the Wnt/ β -catenin signaling pathway", *Cellular Physiology and Biochemistry*, Karger Publishers, Vol. 43 No. 6, pp. 2226–2241.

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. & Hekimi, S. (2018), "Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling", *Journal of Cell Biology*, Vol. 217 No. 6, pp. 1915–1928.

WHO. (2017), *Guidelines for Drinking-Water Quality: Incorporating First Addendum*, World Health Organization, Brazil.

Widayati, E. (2020), "Oxidasi biologi, radikal bebas, dan antioxidant", *Majalah Ilmiah Sultan Agung*, Vol. 50 No. 128, pp. 26–32.

Yokel, R. (2012), "The pharmacokinetics and toxicology of aluminum in the brain", *Current Inorganic Chemistry*, Bentham Science Publishers, Vol. 2 No. 1, pp. 54–63.

Yokel, R.A. (2020), "Aluminum reproductive toxicity: a summary and interpretation of scientific reports", *Critical Reviews in Toxicology*, Taylor & Francis, Vol. 50 No. 7, pp. 551–593.

Yuan, C.-Y., Lee, Y.-J. & Hsu, G.-S.W. (2012), "Aluminum overload increases oxidative Stress in four functional brain areas of neonatal rats", *Journal of Biomedical Science*, BioMed Central, Vol. 19 No. 1, pp. 1–9.

Yuliani, S., Mustofa & Partadiredja, G. (2019), "The neuroprotective effects of an ethanolic turmeric (*Curcuma longa* L.) extract against trimethyltin-induced oxidative Stress in rats", *Nutritional Neuroscience*, Taylor & Francis, Vol. 22 No. 11, pp. 797–804.

Zahra, A.P., Farishal, A. & Siregar, B.A. (2020), "Potensi Curcumin sebagai Modalitas Terapi Suportif Pada Pasien Kanker Payudara", *Jurnal Majority*, Vol. 9 No. 1, pp. 56–61.

Zhang, C., Bruins, M.E., Yang, Z., Liu, S. & Rao, P. (2016), "A new formula to calculate activity of superoxide dismutase in indirect assays", *Analytical Biochemistry*, Elsevier, Vol. 503, pp. 65–67.

Zhang, Q.-F., Li, Y.-W., Liu, Z.-H. & Chen, Q.-L. (2016), "Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: histological damage, oxidative Stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis", *Aquatic Toxicology*, Elsevier, Vol. 177, pp. 417–424.

Lampiran 1

Ethical Clearance Biosains Universitas Brawijaya



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 018-KEP-UB-2021

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

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH EKSTRAK KUNYIT TERHADAP KADAR SUPEROKSIDA DISMUTASE OTAK DAN OVARIUM, KADAR MALONDIALDEHID (MDA) OTAK DAN OVARIUM, KADAR ESTRADIOL (E2)SERUM DAN KADAR FOLLICLE STIMULATING HORMONE (FSH)SERUM PADA TIKUS PUTIH BETINA (*Rattus norvegicus*) GALUR WISTAR YANG DIPAPAR ALUMUNIUUM

PENELITI : HUSNUL KHOTIMAH

ANGGOTA : ANISSA ERMASARI WORO TOMIA NUNINGTIAS
NINA RINI SUPROBO

UNIT/LEMBAGATEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 15 Maret 2021
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2

Surat Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia
Telp. +62341 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192, Fax. +62341 565420
E-mail : sekr_fk@ub.ac.id <http://fk.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN

Nomor 418 /UN10.F08.08/ PK.03.08.3/2021

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIP/NIK : 2012018705212001
pangkat dan golongan : Penata Muda Tk. I, III/b
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,

nama : Anissa Ermasari
NIM : 196070400111021
program studi : Magister Kebidanan
judul : Pengaruh Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap Kadar Superoksida Dismutase Otak dan Kadar Follicle Stimulating Hormone Serum Tikus Betina (*Rattus noevvegicus*) yang dipapar Alumunium
jenis artikel : Tesis
jumlah halaman : 101

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki kemiripan 3 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 28 Juli 2021

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIK 2012018705212001

Lampiran 3
Bukti **Accepted Jurnal 1**



ICoLiST 2021

4th International Conference on Life Sciences and Technology
Universitas Negeri Malang, 31 August 2021
Website: <http://icolist.biologi.um.ac.id/2021>
Email: icolist.biologi@um.ac.id

Date: 27 July 2021

Letter of Acceptance for Abstract

Dear Authors: Husnul Khotimah (a), Anissa Ermasari (b), Nina Rini Suprobo (b), Woro Tamia Nuningtias (b), Sutrisno Sutrisno (c), I Wayan ArsanaWiyasa (d), and Eviana Norahmawati (e)

We are pleased to inform you that your abstract (ABS-24, Oral Presentation), entitled:

"Protective Effect of Ethanolic Turmeric (*Curcuma longa*) Extract, Against Aluminium-Induced Oxidative Stress Toxicity"

has been reviewed and accepted to be presented at ICoLiST 2021 conference to be held on 31 August 2021 in Malang, Indonesia.

Please submit your full paper and make the payment for registration fee before the deadlines, visit our website for more information.

Thank You.

Best regards,



Assist. Prof. Hendra Susanto, S.Pd., M.Kes., Ph.D.
ICoLiST 2021 Chairperson



Konfrenzi.com - Conference Management System

Lampiran 4
Bukti Accepted Jurnal 2



ICoLiST 2021

4th International Conference on Life Sciences and Technology
Universitas Negeri Malang, 31 August 2021
Website: <http://icolist.biologi.um.ac.id/2021>
Email: icolist.biologi@um.ac.id

Date: 16 July 2021

Letter of Acceptance for Abstract

Dear Authors: Husnul Khotimah (a*), Nina Rini Suprobo (b), Anissa Ermasari (b), Woro Tamia Nuningtias (b), and Sutrisno Sutrisno (c)

We are pleased to inform you that your abstract (ABS-17, Oral Presentation), entitled:

"Curcuma longa as Potent Anti-infertiliy Agents: In Silico Studies"

has been reviewed and accepted to be presented at ICoLiST 2021 conference to be held on 31 August 2021 in Malang, Indonesia.

Please submit your full paper and make the payment for registration fee before the deadlines, visit our website for more information.

Thank You.

Best regards,



Assist. Prof. Hendra Susanto, S.Pd., M.Kes., Ph.D.
ICoLiST 2021 Chairperson



Lampiran 5

Dokumentasi Penelitian

1. Pembuatan Sediaan Ekstrak Kunyit



Bubuk Kunyit berasal dari Materia Medica Batu



Hasil Ekstrak Kunyit di Materia Medica Batu



Proses melarutkan Ekstrak kunyit dilarutkan dalam PBS



Sediaan 3 dosis ekstrak kunyit yang telah dilarutkan siap diberikan ke tikus betina

2. Pengenceran dan pembuatan sediaan $AlCl_3$



Jenis Aluminium yang digunakan adalah Art. 801081 Aluminium chlorid. Aluminium ($AlCl_3$) ditimbang kemudian dilarutkan menghasilkan Sediaan $AlCl_3$ dengan dosis 100 mg

3. Pemeliharaan hewan Coba



Hewan coba yang digunakan dalam penelitian



Penimbangan Hewan Coba



Pembuatan makanan hewan coba

4. Swab Vagina Tikus



Pengambilan Swab Vagina pada hewan coba

Slide Apusan Vagina

5. Pembedahan Tikus

<p>Injeksi ketamine pada hewan coba</p>	<p>Tikus setelah diinjeksi ketamine</p>
<p>Pengambilan darah jantung tikus</p>	<p>Pengambilan organ otak tikus</p>
<p>Darah tikus diletakkan ditabung dan segera di centrifuge untuk mendapatkan serum</p>	<p>Organ otak tikus diletakkan di plastic klip dan disimpan pada suhu -80°C</p>

6. Pembuatan Buffer SOD

<p>Buffer SOD yang terdiri dari EGTA, manitol, HEPES, Sucrose, EDTA</p>	<p>Pembuatan Buffer SOD diaduk dengan <i>magnetic stirrer</i></p>

7. Pembuatan supernatant Organ otak



Penimbangan Organ Otak



Penggerusan organ otak yang dilarutkan dalam buffer SOD & Hasil gerusan organ otak dimasukkan kedalam appendoff



Hasil gerudan dimasukkan ke mesin centrifuge dingin

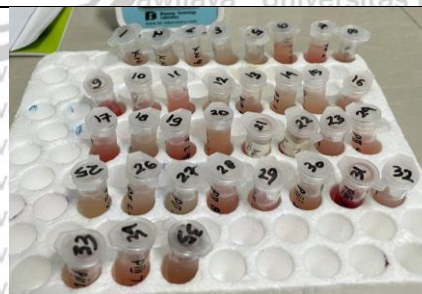


Pengambilan supernatant otak untuk disimpan pada suhu -20°C

8. Pemeriksaan Kadar SOD dan FSH dengan Metode ELISA



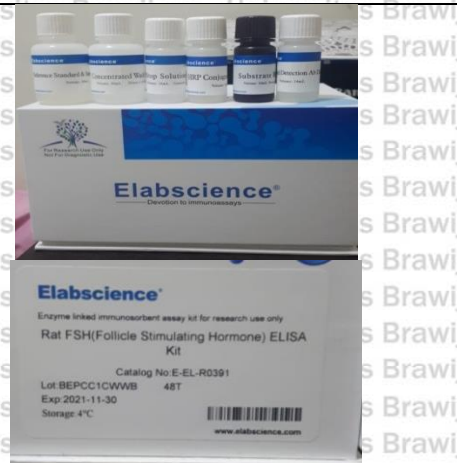
Supernatant organ otak tikus



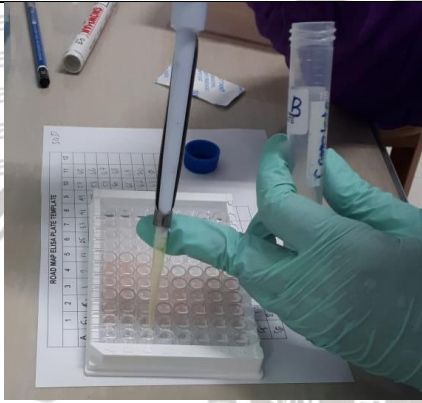
Serum tikus yang sudah dipisahkan dari sel darah merah dengan sentrifugasi



Rat SOD ELISA kit



Rat FSH ELISA kit



Standard dan working reagen telah dimasukkan kedalam well



Proses pencucian dengan wash buffer



Plate washer



Proses Inkubasi



Penambahan *stop solution* ke dalam tiap well



Warna biru akan berubah dengan cepat menjadi warna kuning



Pembacaan ELISA dengan alat spektrofotometri pada panjang gelombang 450nm

Lampiran 6
Data Berat Badan Tikus

KELOMPOK	NOMOR TIKUS	07/04/21	14/04/21	21/04/21	28/04/21	05/05/21
		BB(g)	BB(g)	BB(g)	BB(g)	BB(g)
Kontrol Negatif (KN)	1	190	201	198	200	195
	2	170	191	195	196	191
	3	144	156	154	156	154
	4	179	189	186	185	183
	5	199	208	206	214	210
Kontrol Positif (KP)	1	214	213	204	211	211
	2	165	164	159	164	164
	3	172	170	172	180	181
	4	153	161	170	176	182
	5	203	203	201	208	207
Kelompok Perlakuan 1 (P1)	1	212	222	220	220	220
	2	145	150	153	152	157
	3	216	216	217	218	220
	4	160	170	168	168	176
	5	149	160	165	169	166
Kelompok Perlakuan 2 (P2)	1	214	227	232	229	229
	2	215	216	222	228	224
	3	262	233	232	230	229
	4	181	186	222	182	182
	5	231	246	248	244	248
Kelompok Perlakuan 3 (P3)	1	244	240	234	241	240
	2	204	206	208	207	215
	3	226	227	229	223	226
	4	208	218	211	211	221
	5	162	175	192	191	192

Lampiran 7

Hasil Analisis Statistik kadar SOD

1. Hasil Uji Normalitas Data Kadar SOD Otak

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SOD	KN	,196	5	,200 [*]	,930	5	,594
	KP	,295	5	,180	,884	5	,327
	P1	,184	5	,200 [*]	,953	5	,762
	P2	,307	5	,139	,797	5	,076
	P3	,277	5	,200 [*]	,900	5	,409

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Homogenitas Data Kadar SOD Otak

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
SOD	Based on Mean	1,222	4	20	,333
	Based on Median	1,027	4	20	,417
	Based on Median and with adjusted df	1,027	4	11,037	,435
	Based on trimmed mean	1,146	4	20	,364

3. Hasil Uji Perbandingan Kadar SOD Otak

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval For Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
KN	5	6,3180	1,14316	4,8986	7,7374	5,19	8,10
KP	5	4,3560	1,91710	1,9756	6,7364	1,19	6,21
P1	5	5,5780	0,59672	4,8371	6,3189	4,90	6,41
P2	5	5,0060	0,37461	4,5409	5,4711	4,59	5,36
P3	5	3,5700	1,54418	1,6526	5,4874	2,05	6,08

ANOVA

SOD						
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	22,625	4	5,656	3,597	,023	
Within Groups	31,452	20	1,573			
Total	54,077	24				

4. Post Hoc Test LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SOD

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	1,96200*	,79312	,022	,3076	3,6164
		P1	,74000	,79312	,362	-,9144	2,3944
		P2	1,31200	,79312	,114	-,3424	2,9664
		P3	2,74800*	,79312	,002	1,0936	4,4024
	KP	KN	-1,96200*	,79312	,022	-3,6164	-,3076
		P1	-1,22200	,79312	,139	-2,8764	,4324
		P2	-,65000	,79312	,422	-2,3044	1,0044
		P3	,78600	,79312	,334	-,8684	2,4404
	P1	KN	-,74000	,79312	,362	-2,3944	,9144
		KP	1,22200	,79312	,139	-,4324	2,8764
		P2	,57200	,79312	,479	-1,0824	2,2264
		P3	2,00800*	,79312	,020	,3536	3,6624
	P2	KN	-1,31200	,79312	,114	-2,9664	,3424
		KP	,65000	,79312	,422	-1,0044	2,3044
		P1	-,57200	,79312	,479	-2,2264	1,0824
		P3	1,43600	,79312	,085	-,2184	3,0904
	P3	KN	-2,74800*	,79312	,002	-4,4024	-1,0936
		KP	-,78600	,79312	,334	-2,4404	,8684
		P1	-2,00800*	,79312	,020	-3,6624	-,3536
		P2	-1,43600	,79312	,085	-3,0904	,2184

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

5. Homogeneous Subsets

SOD

	Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	P3	5	3,5700		
	KP	5	4,3560	4,3560	
	P2	5	5,0060	5,0060	5,0060
	P1	5		5,5780	5,5780
	KN	5			6,3180
	Sig.			,101	,160

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 8

Hasil Analisis Statistik kadar SOD

1. Hasil Uji Normalitas Data Kadar FSH Serum

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FSH	KN	,170	5	,200*	,948	5	,724
	KP	,335	5	,069	,814	5	,105
	P1	,264	5	,200*	,878	5	,302
	P2	,300	5	,161	,899	5	,407
	P3	,208	5	,200*	,940	5	,668

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Homogenitas Data Kadar FSH Serum

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
FSH	Based on Mean	2,674	4	20	,062
	Based on Median	,987	4	20	,437
	Based on Median and with adjusted df	,987	4	13,097	,448
	Based on trimmed mean	2,501	4	20	,075

3. Hasil Uji Perbandingan Kadar FSH Serum

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval For Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
KN	5	57,4280	20,95606	31,4076	83,4484	36,00	88,38
KP	5	31,7540	14,78985	13,3900	50,1180	10,67	43,43
P1	5	50,0300	10,31339	37,2242	62,8358	41,05	64,95
P2	5	38,0980	7,48130	28,8087	47,3873	30,29	50,29
P3	5	30,6680	8,57177	20,0247	41,3113	21,24	43,14

ANOVA

FSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2751,534	4	687,883	3,848	,018
Within Groups	3574,828	20	178,741		
Total	6326,361	24			

4. Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable: FSH

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	25,67400*	8,45556	,007	8,0360	43,3120
		P1	7,39800	8,45556	,392	-10,2400	25,0360
		P2	19,33000	8,45556	,033	1,6920	36,9680
		P3	26,76000*	8,45556	,005	9,1220	44,3980
	KP	KN	-25,67400*	8,45556	,007	-43,3120	-8,0360
		P1	-18,27600*	8,45556	,043	-35,9140	-,6380
		P2	-6,34400	8,45556	,462	-23,9820	11,2940
		P3	1,08600	8,45556	,899	-16,5520	18,7240
	P1	KN	-7,39800	8,45556	,392	-25,0360	10,2400
		KP	18,27600*	8,45556	,043	,6380	35,9140
		P2	11,93200	8,45556	,174	-5,7060	29,5700
		P3	19,36200*	8,45556	,033	1,7240	37,0000
	P2	KN	-19,33000	8,45556	,033	-36,9680	-1,6920
		KP	6,34400	8,45556	,462	-11,2940	23,9820
		P1	-11,93200	8,45556	,174	-29,5700	5,7060
		P3	7,43000	8,45556	,390	-10,2080	25,0680
P3	KN	-26,76000*	8,45556	,005	-44,3980	-9,1220	
	KP	-1,08600	8,45556	,899	-18,7240	16,5520	
	P1	-19,36200*	8,45556	,033	-37,0000	-1,7240	
	P2	-7,43000	8,45556	,390	-25,0680	10,2080	

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

RIWAYAT HIDUP

Anissa Ermasari, lahir di Purwosari, 10 April 1995, anak kedua dari dua bersaudara, putri dari Bapak Giyatno dan Ibu Nurjannah. Pendidikan formal dimulai dari SD Negeri 4 Metro Utara dan lulus pada tahun 2007. Lulus SMP Negeri 1 Metro pada tahun 2010 dan lulus SMA Negeri 1 Metro tahun 2013.



Melanjutkan pendidikan Diploma IV (DIV) Kebidanan di Poltekkes Kementrian kesehatan Tanjung Karang Prodi Kebidanan Metro tahun 2013 dan lulus pada tahun 2017. Pada tahun 2017 melanjutkan pendidikan program profesi bidan di Poltekkes Kemenkes Surakarta dan lulus pada tahun 2018. Tahun 2019 mengambil Program Studi Magister Kebidanan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan lulus pada tahun 2021.

