



**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL TERHADAP
JUMLAH FOLIKEL DAN KADAR MALONDIALDEHYDE
OVARIUM TIKUS BETINA GALUR WISTAR YANG
DIPAPAR RHODAMIN B**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
HUDA ROHMAWATI
166070400111023**

**PROGAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



TESIS

**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL TERHADAP
JUMLAH FOLIKEL DAN KADAR MALONDIALDEHYDE
OVARIUM TIKUS BETINA GALUR WISTAR YANG
DIPAPAR RHODAMIN B**

Oleh:
HUDA ROHMAWATI
166070400111023

Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal: 10 September 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM
NIP 196701231996011001
Ketua

dr. Pande Made Dwijayasa, Sp. OG(K)
NIP 196401141998031002
Anggota

Malang, 25 SEP 2018
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan



Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes
NIP 195804141987012001



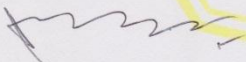
TESIS

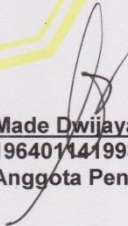
**PENGARUH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL TERHADAP
JUMLAH FOLIKEL DAN KADAR MALONDIALDEHYDE
OVARIUM TIKUS BETINA GALUR WISTAR YANG
DIPAPAR RHODAMIN B**

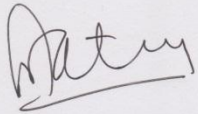
Oleh:
HUDA ROHMAWATI
166070400111023


Dipertahankan didepan penguji
pada tanggal: 10 September 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI


dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM
NIP 196701231996011001
Ketua


dr. Pande Made Dwijayasa, Sp. OG(K)
NIP 196401141998031002
Anggota Penguji


Dr. dr. Setyawati Soeharto, M. Kes
NIK 171152693
Anggota Penguji


Dr. dr. Endang Sri Wahyuni, MS
NIK 171152694
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, 10 September 2018

Mahasiswa,



Nama : Huda Rohmawati
NIM : 166070400111023
PS : Magister Kebidanan
Fak : Kedokteran UB



LEMBAR PERSEMBAHAN

*Karya ilmiah ini kupersembahkan
 untuk beliau yang kuhormati, bapak, ibu dan mertuaku
 serta suamiku tersayang Moch. Rifai
 juga kedua buah hatiku M. R. Al Fatih dan M. Hamzah A.
 Terimakasih untuk doa tulus, cinta, kasih sayang dan semua dukungannya.*



RINGKASAN

Huda Rohmawati

Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap jumlah folikel dan kadar *Malondialdehyde* ovarium tikus betina Galur Wistar yang dipapar rhodamin B

Ketua Komisi Pembimbing dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M ; Anggota dr. Pande Made Dwijayasa, Sp.OG(K)

Kejadian infertil meningkat setiap tahun dan berdampak pada masalah medis dan psikologis pasangan subur. Infertil (50,3%) disebabkan oleh gangguan ovulasi. Gangguan ovulasi disebabkan oleh gangguan folikulogenesis sehingga folikel atresia dan tidak berkembang. Atresia folikel disebabkan apoptosis dan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi lipid yang bisa diketahui dari peningkatan kadar MDA. Stres oksidatif terjadi karena adanya peningkatan radikal bebas dari zat toksin, salah satunya dari makanan yang mengandung zat toksin berupa penambahan pewarna makanan rhodamin B.

Rhodamin B merupakan pewarna sintesis untuk industri. Penggunaan rhodamin B sudah dilarang tetapi masih disalahgunakan dalam pembuatan makanan yaitu sebagai pewarna makanan. Rhodamin B termasuk xenobiotik, memiliki ikatan halogen yang radikal dan berbahaya sehingga dapat meningkatkan ROS. ROS dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel, dapat diminimalisasi dengan antioksidan dan sistem perbaikan dari tubuh. Salah satu sumber antioksidan alami adalah EVOO.

Penelitian dilakukan secara *True Experimental Post Test Only Control Group Design*.

Menggunakan 25 ekor tikus betina dibagi menjadi 1 kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, 1 kelompok kontrol positif dengan pemberian rhodamin B 18 mg/200gr BB dan 3 kelompok perlakuan dengan pemberian EVOO peroral dosis 1,5 ml/Kg BB, 3 ml/Kg BB, 4,5 ml/Kg BB serta dipapar rhodamin B 18 mg/200 gr BB selama 36 hari. Kemudian dilakukan pembedahan pada fase proestrus dan dilakukan pemeriksaan jumlah folikel dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dan pengukuran kadar MDA dengan *Spectrofotometri*.

Hasil dari penelitian ini, bahwa jumlah folikel dan kadar MDA pada uji normalitas data dan homogenitas memiliki nilai signifikansi $> 0,05$, sehingga data terdistribusi normal dan memiliki ragam data yang homogen. Rata-rata jumlah folikel tertinggi pada kelompok perlakuan P3 $5,67 \pm 1,75$ dan terendah pada kelompok positif $1 \pm 0,89$. Dari hasil uji *Anova*, didapatkan nilai signifikansi pada jumlah folikel adalah 0,001. Nilai signifikansi tersebut lebih kecil dari alpha (0,05) maka H_0 ditolak sehingga EVOO dapat meningkatkan jumlah folikel. Pada uji LSD diketahui bahwa terdapat perbedaan jumlah folikel yang signifikan antara P3 dengan P1, kontrol positif dan kontrol negatif namun tidak berbeda signifikan dengan P2.

Rerata kadar MDA tertinggi pada kelompok kontrol positif $13,46 \pm 3,16$ dan terendah pada kelompok P3 sebanyak $6,68 \pm 2,62$. Dari hasil uji *Anova*, didapatkan nilai signifikansi kadar MDA sebesar 0,001 sehingga signifikansi $< \alpha$ (0,05) maka H_0 ditolak, sehingga terdapat perbedaan/pengaruh yang signifikan pemberian EVOO terhadap kadar MDA. Pada uji LSD diketahui bahwa terdapat perbedaan nilai kadar MDA pada P3 yang signifikan dengan kontrol negatif, kontrol positif, dan P1 namun tidak berbeda signifikan dengan P2.

Stres oksidatif karena produksi ROS tinggi yang didapatkan dari paparan rhodamin B mampu meningkatkan kadar MDA, menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel, sehingga terjadi kerusakan pada sel, jaringan dan organ. Selain itu peningkatan kadar MDA mengakibatkan penurunan jumlah semua jenis folikel ovarium. Produksi ROS yang berlebihan dapat mengganggu fungsi mitokondria yang berada pada oosit dan embrio. Dalam sistem reproduksi ROS dalam jumlah normal dapat berfungsi mengatur proses fisiologis pematangan oosit, tetapi bila jumlahnya berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga dapat merusak molekul dan struktur sel oosit, sel granulosa dan kerusakan DNA.

EVOO merupakan minyak zaitun yang mengandung antioksidan, memiliki kandungan polifenol yang tinggi. Antioksidan dapat membantu melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas. EVOO termasuk antioksidan non-enzimatis yang bersifat preventif dengan pembentukan oksigen yang reaktif.

**SUMMARY****Huda Rohmawati**

Effect of Extra Virgin Olive Oil on Follicles and levels of *Malondialdehyde* ovary female rats Wistar strain exposed to Rhodamin B Chairman of Supervising Commission dr. Hidayat Sujuti, Ph.D. Sp.M; Member dr. Pande Made Dwijayasa, Sp.OG (K)

Infertile incidence increases every year and affects the medical and psychological problems of the fertile couple. Infertile (50.3%) is caused by ovulation disorders. Ovulatory disorders are caused by impairment of folliculogenesis so that the follicle is atresia and does not develop. Atresia follicles are caused by apoptosis and oxidative stress. Oxidative stress can cause known lipid peroxidation from elevated MDA levels. Oxidative stress occurs because of the increase of free radicals from toxin substances, one of the foods containing toxin substances in the form of the addition of rhodamine B. food coloring.

Rhodamin B is a synthetic dye for the industry. The use of rhodamine B has been banned but still misused in the manufacture of food that is as food coloring. Rhodamine B includes xenobiotic, has a radical and dangerous halogen bond that can increase ROS. ROS can cause cell damage and death, can be minimized with antioxidants and repair systems from the body. One source of natural antioxidants is EVOO. The experiment was carried out true experimental post test only control group design. Using 25 female rats divided into 1 group of negative control without treatment, 1 group of positive control with rhodamine B 18 mg / 200 gr BB and 3 treatment group with EVOO giving peroral dose 1.5 ml / Kg BW, 3 ml / Kg BW, 4.5 ml / kg body weight and exposure to rhodamine B 18 mg / 200 gr BB for 36 days. Then performed surgery on the proestrus phase and examined the number of follicles with hematoxylin-eosin staining and measurement of MDA levels with spectrophotometry.

The The results of this study, that the number of follicles and MDA levels in the data normality test and homogeneity have a significance value > 0.05 , so the data is normally distributed and has a homogeneous variety of data. The highest average number of follicles in the P3 treatment group was 5.67 ± 1.75 and the lowest in the positive group was 1 ± 0.89 . From the ANOVA test results, obtained a significance value on the number of follicles is 0.001. The significance value is smaller than alpha (0.05) so H_0 is rejected so that there is an influence of EVOO on the number of follicles. In the LSD test it is known that there are significant differences in the number of follicles between P3 and P1, positive controls and negative controls but not significantly different from P2.

The highest average MDA level in the positive control group was 13.46 ± 3.16 and the lowest in the P3 group was 6.68 ± 2.62 . From the ANOVA test results, obtained the significance value of MDA levels of 0.001 so that the significance $< \alpha$ (0.05) then H_0 was rejected, so that there was a significant difference / effect of giving EVOO to MDA levels. In the LSD test it is known that there are significant differences in MDA levels in P3 with negative controls, positive controls, and P1 but not significantly different from P2.

Oxidative stress due to high ROS production obtained from exposure to rhodamine B can increase MDA levels, causing lipid peroxidation in cell membranes, resulting in damage to cells, tissues, and organs. In addition, elevated MDA levels result in a decrease in the number of all types of ovarian follicles. Excessive ROS production can disrupt the function of mitochondria located in oocytes and embryos. In the normal reproductive system, ROS can function to regulate the physiological process of oocyte maturation, but if excessive amounts can cause oxidative stress that can damage the molecules and cell structure of oocytes, granulosa cells, and DNA damage. EVOO is an olive oil that contains antioxidants, has a high content of polyphenols. Antioxidants can help protect cells from oxidative damage caused by free radicals. EVOO includes non-enzymatic antioxidants with a reactive oxygen formation.

EVOO can increase the number of follicles and decrease ovarian MDA levels in female mice exposed to rhodamine B



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* Terhadap Jumlah Folikel dan Kadar *Malondialdehyde* Ovarium Tikus Betina Galur Wistar Yang Dipapar Rodamin B” di Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Dalam penyusunan tesis ini penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan namun berkat bantuan, bimbingan dan petunjuk serta dorongan dari semua pihak, akhirnya tesis ini dapat diselesaikan tepat waktu. Maka dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani A.R, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan selama menempuh pendidikan Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan selama menempuh pendidikan Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis menempuh pendidikan di Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG(K), selaku Ketua Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang memberikan semangat dan dukungan selama menempuh pendidikan di Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



5. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM, selaku pembimbing I yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan masukan selama proses penyusunan tesis ini

6. dr. Pande Made Dwijayasa, Sp.OG(K), selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.

7. Bapak dan ibu dosen serta seluruh staf Progam Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah membantu dalam menyelesaikan tesis ini.

8. Teman-teman seperjuangan mahasiswa Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Angkatan ke VII yang telah membantu dan memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang sifatnya membangun sehingga bisa digunakan untuk perbaikan di masa yang akan datang.

Semoga tesis ini bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, September 2018

Penulis

**DAFTAR ISI**

LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iv
HALAMAN PERUNTUKAN	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Rhodamin B	6
2.1.1 Definisi Rhodamin B	6
2.1.2 Dampak Rhodamin B pada Kesehatan	8
2.1.3 Pengaruh Rhodamin B terhadap Organ Reproduksi	11
2.2 Antioksidan	11
2.3 Zaitun (<i>Olea europaea</i>)	12
2.3.1 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Zaitun	12
2.3.2 Jenis-jenis Minyak Zaitun	16
2.3.3 Kandungan Extra Virgin Olive Oil	17
2.3.4 Manfaat Extra Virgin Olive Oil	18
2.4 Ovarium	19



2.4.1 Pengertian Ovarium	19
2.4.2 Tahap Perkembangan Folikel	20
2.5 Radikal Bebas, Stres Oksidatif, <i>Malondialdehyde</i> (MDA)	22
2.5.1 Radikal Bebas, Stres Oksidatif, <i>Malondialdehyde</i> (MDA) ...	22
2.5.2 Pengaruh ROS pada Reproduksi Wanita	24
2.6 Tikus Putih	27
2.6.1 Karakteristik Tikus Putih	27
2.6.2 Siklus Reproduksi Tikus	29
2.7 Kerangka Teori	32
2.8 Keterangan Kerangka Teori	33
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	35
3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Keterangan Kerangka Konsep	36
3.3 Hipotesis Penelitian	36
BAB 4 METODE PENELITIAN	37
4.1 Rancangan Penelitian	37
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	37
4.3 Subyek Penelitiandan Replikasi	38
4.3.1 Subyek Penelitian	38
4.3.2 Replikasi	39
4.4 Variabel Penelitian	40
4.4.1 Variabel Independen	40
4.4.2 Varabel Dependen	40
4.5 Definisi Operasional	40
4.6 Prosedur Penelitian	41
4.6.1 Pemeliharaan Hewan Coba	41
4.6.2 Pemaparan Rhodamin B	43
4.6.3 Pemberian <i>Extra Virgin Olive Oil</i>	43
4.6.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ	44
4.6.5 Pemeriksaan Jumlah Folikel Ovarium	45
4.6.6 Pemeriksaan Kadar MDA	47
4.6.7 Pembuangan Hewan Coba	49
4.7 Teknik Analisa Data	49
4.7.1 Uji Prasyarat Parametrik	49
4.7.2 Uji One Way Annova	50
4.8 Alur Penelitian	51
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	52
5.1 Gambaran Hispatologi Jaringan Ovarium	52
5.2 Uji Prasyarat Parametrik Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel dan kadar MDA Ovarium pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B	53
5.3 Analisis Data Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B	54
5.4 Analisis Data Pengaruh EVOO terhadap Kadar <i>Malondialdehyde</i> Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B	55
BAB 6 PEMBAHASAN	56
6.1 Pengaruh <i>Extra Virgin Olive Oil</i> terhadap Peningkatan Jumlah Folikel Ovarium Tikus Betina Galur Wistar Yang Dipapar Rhodamin B	56



6.2 Pengaruh <i>Extra Virgin Olive Oil</i> menurunkan kadar <i>Malondialdehyde</i> Ovarium Tikus Betina Galur Wistar Yang Dipapar Rhodamin B.....	59
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	63
BAB 7 PENUTUP	64
7.1 Kesimpulan.....	64
7.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	72
RIWAYAT HIDUP	90



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Parameter Normal Fisiologi Reproduksi dan Biologi Tikus.....	28
Tabel 4.1	Kandungan Pakan Standar.....	42
Tabel 5.1	Hasil Uji Prasyarat Parametrik Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel dan Kadar <i>Malondialdehyde</i> Ovarium pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B.....	54
Tabel 5.2	Hasil Uji <i>One Way Anova</i> pada Jumlah Folikel Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B.....	54
Tabel 5.3	Hasil Uji <i>One Way Anova</i> pada Kadar <i>Malondialdehyde</i> Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B.....	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur senyawa kimia rhodamin B	6
Gambar 2.2	Pohon zaitun	13
Gambar 2.3	Buah zaitun	15
Gambar 2.4	Sumber pembentukan radikal bebas	22
Gambar 2.5	Tikus putih	27
Gambar 2.6	Sitologi vagina tikus pada siklus estrus	29
Gambar 2.7	Kerangka teori	32
Gambar 3.1	Kerangka konsep	35
Gambar 4.1	Skema alur penelitian	51
Gambar 5.1	Histopatologi jaringan ovarium	52
Gambar 5.2	Folikel ovarium	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Kelaikan Etik.....	72
Lampiran 2	Surat Keterangan Bebas Plagiasi.....	73
Lampiran 3	Bukti Accepted Jurnal.....	74
Lampiran 4	Dokumentasi Penelitian.....	75
Lampiran 5	Analisis Data.....	80
Lampiran 6	Hasil Uji Antioksidan.....	89



DAFTAR SINGKATAN

BB	: Berat Badan
BNT	: Beda Nyata Terkecil
BPS	: Badan Pusat Statistik
Cat	: <i>Catalase</i>
CL	: <i>Corpus Luteum</i>
Cl	: <i>Klorida</i>
CO ₂	: <i>Carbon Dioxide</i>
Cu ²⁺	: <i>Cupric Cation</i>
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EVOO	: <i>Extra Virgin Olive Oil</i>
Fe ²⁺	: <i>Ferro</i>
FSH	: <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GnRH	: <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GPx	: <i>Glutathione Peroksidase</i>
Gr	: Gram
Gred	: <i>Glutathione Reduktase</i>
GSH	: <i>Glutathione</i>
GS-SG	: <i>Glutathione Disulfide</i>
H ₂ O	: <i>Hidrogen Oksida</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
HCl	: <i>Hidrogen Klorida</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
Kg	: Kilogram



LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
LSD	: <i>Least Significant Difference</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
Mg	: <i>Mili Gram</i>
ml	: <i>Mili Liter</i>
MUFA	: <i>Monosaturated Fatty Acid</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NSFG	: <i>National Survey of Family Growth</i>
O ²	: <i>Oxygen</i>
O ₂ ⁻	: <i>Superoksida</i>
OH ⁻	: <i>Hidrogen</i>
PAH	: <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i>
PCOS	: <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Spesies</i>
SFA	: <i>Saturated Fatty Acid</i>
SOD	: <i>Superoksida Dismutase</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric Acid Method</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



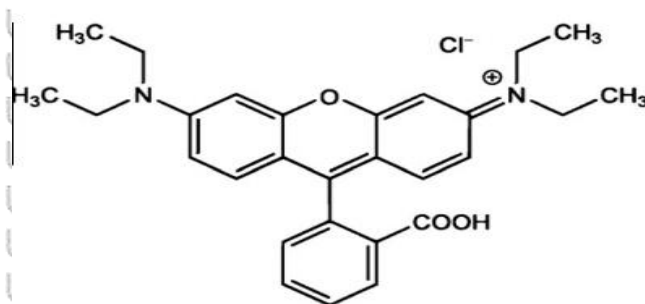
BAB 2 TINJUAN PUSTAKA

2.1 Rhodamin B

2.1.1 Definisi Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat warna sintetis berbentuk serbuk kristal berwarna kehijauan, apabila larut air dalam konsentrasi yang tinggi berwarna merah keunguan dan pada konsentrasi rendah berwarna merah terang (Nurmasari *et al*, 2014). Bila ditambahkan pada makanan akan menghasilkan warna merah terang dan berflourensi (Kusmayadi dan Sukandar, 2009).

Rhodamin B memiliki rumus molekul ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$) dengan berat molekul sebesar 479 g/mol. Rhodamin B memiliki berbagai nama lain, yaitu: *Tetra ethyl Rhodamine*, *Rheonine B*, *D & C*, *Food Red 15*, *ADC Rhodamine B*, *Aizan Rhodamone* dan *Briliant Pink B*. Nama kimia *Rhodamin B* adalah *N-[9-(carboxyphenyl)-6-(diethylamino)-3-xanten-3-ylidene]-N-ethylethanaminium chloride* (Evelyn, 2009).



Gambar 2.1 Struktur senyawa kimia rhodamin B (Soylak *et al*, 2011)

Keterangan: Struktur kimia rhodamin B adalah $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$. Terdapat ikatan dengan senyawa klor (Cl) dan senyawa pengalkilasi CH_3-CH_3 yang bersifat halogen dan sangat radikal.

Rhodamin B termasuk dalam keluarga senyawa kimia digunakan sebagai pewarna tekstil seperti rhodamin 6G, rhodamin B dan lain-lain (Duran *et al*, 2011; Yu *et al*, 2011). Rhodamin umumnya beracun dan larut dalam air, metanol dan

etanol (Ma dan Yao, 1998). Pada awalnya rhodamin B digunakan sebagai pewarna dalam industri tekstil, salah satu pewarna *xanthene* basa yang paling penting, terkenal dengan stabilitas yang baik (Mehrdad, 2009).

Molekul rhodamin B termasuk golongan *xanthenes dyes*, dapat memberikan warna akibat adanya gugus kromofor. Kromofor merupakan gugus tak jenuh yang terdapat pada ikatan kovalen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya absorpsi elektronik dan cahaya misalnya C=C, C=O dan NO₂. Gugus kromofor tersebut mengandung senyawa quinoid sehingga kualitas warna yang dihasilkan sangat tajam bila dibandingkan dengan jenis pewarna lain hal ini disebabkan karena adanya dua gugus auksokrom yang terdiri dari *dimetil ammina* (CH₃-CH₃-NH) (Suciati, 2014). *Quinone* adalah pembawa elektron dan proton yang berperan utama dalam metabolisme aerobik setiap sel dan melakukan reaksi redoks di dalam mitokondria, aparatus golgi, membran plasma, dan retikulum endoplasma. *Quinone* juga dapat melalui siklus redoks dengan radikal *semiquinon*, yang menyebabkan pembentukan spesies oksigen relatif, termasuk superoksida, hidrogen peroksida dan akhirnya radikal hidroksil (Madeo *et al*, 2013). Gugus auksokrom merupakan gugus jenuh dengan adanya elektron bebas atau tidak terikat, dimana jika gugus ini bergabung dengan kromofor, akan mempengaruhi panjang gelombang dan intensitas absorban (Dachriyanus, 2004).

Bahan kimia yang berpotensi menimbulkan toksisitas adalah golongan *xenobiotic* (Mukono, 2005). *Xenobiotik* merupakan senyawa kimia yang tidak dibutuhkan oleh tubuh makhluk hidup yakni meliputi bahan kimia industri, bahan pengawet, pewarna, penyedap rasa, pestisida, obat-obatan, pencemaran lingkungan (Dewi, 2012). Rhodamin B merupakan pewarna yang dilarang untuk tambahan pangan tetapi sering ditemukan pada berbagai jenis makanan yang berwarna merah terang seperti kue basah, saus, sirup, kerupuk, terasi, tahu dan



lain sebagainya. Karena sifatnya yang beracun maka rhodamin B berbahaya jika dimakan oleh manusia dan hewan, dapat menimbulkan iritasi pada kulit, mata dan saluran pernafasan (Soylak, 2011).

2.1.2 Dampak Rhodamin B Pada Kesehatan

Rhodamin B merupakan zat pewarna tekstil dan kertas yang berbahaya bila dikonsumsi. Oleh karena itu rhodamin B merupakan pewarna yang dilarang untuk tambahan pangan tetapi sering ditemukan pada berbagai jenis makanan, minuman, obat maupun kosmetik. Pemakaian rhodamin B dalam waktu lama akan mengakibatkan kanker dan gangguan fungsi hati. Apabila terpapar rhodamin B dalam waktu singkat dengan jumlah yang besar mengakibatkan gejala akut keracunan rhodamin B (Yuliarti, 2007). Gejala keracunan rhodamin B akan terlihat dengan air kencing yang berwarna merah atau merah muda (Wijaya, 2011).

Menurut data toksisitas dari Sigma Aldrich (2005), LD₅₀ pada tikus secara oral 887mg/kg, secara intraperitoneal 144mg/kg, secara subkutan 180mg/kg.

Rhodamin B akan mengakibatkan iritasi saluran pencernaan apabila masuk melalui makanan, iritasi saluran pernafasan bila terhirup, iritasi kulit bila mengenai kulit, serta iritasi pada mata bila zat tersebut mengenai mata ditandai dengan mata kemerahan, ada cairan serta bengkak (Yuliarti, 2007).

Rhodamin B termasuk golongan *Xenobiotic*, masuk kedalam tubuh melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan dan kontak kulit. Bahan *Xenobiotic* bisa sampai pada organ dan jaringan perifer karena dalam tubuh manusia darah beredar ke seluruh tubuh dan organ. Bersifat *lipofilik* dan sangat berpengaruh pada jaringan tubuh yang mengandung banyak lemak misalnya jaringan syaraf dan otak. Mudah diabsorpsi, tetapi sulit untuk diekskresi (Mukono, 2005).



Rhodamin B merupakan turunan organoklorin. Organoklorin merupakan bahan kimia yang mengandung klorin dan karbon. Organoklorin secara kimia tergolong insektisida yang memiliki toksisitas rendah tapi bisa bertahan pada lingkungan dan dapat terakumulasi dalam jaringan melalui makanan.

Organoklorin dalam tubuh dapat menginduksi sistem sitokrom P-450 dan menurunkan enzim antioksidan di hati, mengoksidasi xenobiotik untuk menghasilkan ROS (Suciati, 2014).

Sebagai turunan dari organoklorin, rhodamin B memiliki struktur kimia yang berikatan dengan senyawa klorin (Cl). Senyawa klorin termasuk senyawa halogen dan radikal. Senyawa halogen memiliki reaktivitas yang tinggi dalam mencapai kestabilan, maka senyawa tersebut dapat menyerang molekul lain yang berdekatan untuk mencari pasangan elektron sehingga dapat merusak bentuk molekul itu sendiri. Oleh karena itu senyawa halogen sangat berbahaya jika terdapat dalam tubuh dalam jumlah yang banyak.

Aktifitas radikal senyawa klorin dapat menyebabkan makromolekul seperti karbohidrat, protein, lemak dan asam nukleat mengalami kerusakan dan menimbulkan toksik yang memicu terjadinya kanker pada manusia (Sulistina, 2014).

Selain mengandung senyawa klorin, rhodamin B mengandung senyawa pengalkilasi ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$) yaitu zat kimia yang dapat menambah gugus alkil pada DNA. Zat-zat tersebut dapat menghasilkan ion karbonium yang bermuatan positif (CH_3^+) yang bergabung dengan basa yang kaya elektron di dalam DNA. Alkilasi DNA dapat menyebabkan kesalahan pasangan basa maupun pemutusan kromosom. Senyawa pengalkilasi juga terdapat bentuk struktur kimia yang *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang bersifat sangat radikal (Lu dan Cederbaum, 2008).



Enzim sitokrom P-450 dependen oksidase mempunyai peran dalam biotransformasi dan detoksifikasi senyawa intermediate *xenobiotic* dan metabolik.

Metabolisme tersebut menghasilkan senyawa peroksida atau senyawa oksigen reaktif, sebenarnya hidrogen peroksida tidak berbahaya dalam kondisi normal tetapi dapat membentuk radikal hidroksil yang sangat berbahaya dan berakibat pada kerusakan struktur sel jika berikatan dengan logam (Winarsi, 2007).

Enzim sitokrom P-450 berjenis hemeprotein sebagai katalis oksidator pada lintasan metabolisme steroid, asam lemak, *xenobiotik*, obat, toksik dan karsinogenik. Metabolisme dengan P-450 dapat menimbulkan metabolit toksik yang merusak sel. Aktivasi oksigen oleh sitokrom P-450 selain diperlukan sebagai katalitik juga dapat menyebabkan terjadinya ROS. ROS dapat diproduksi dari banyak sistem di dalam sel termasuk rantai pernafasan mitokondria. ROS adalah racun bagi sel karena dapat bereaksi dengan makromolekul selular, menonaktifkan enzim atau denaturasi protein, menyebabkan kerusakan DNA sehingga bisa menimbulkan terjadinya mutasi, peroksidasi lipid yang dapat mengakibatkan kerusakan membran biologis dan menghasilkan produk *aldehyd* reaktif seperti malondialdehid atau 4-hidroksinoneril (Sulistina, 2014).

Rhodamin B mengandung senyawa *quinoid*, yang terdapat dalam gugus kromofor. *Quinone* adalah pembawa elektron dan proton yang berperan utama dalam metabolisme aerobik setiap sel dan melakukan reaksi redoks di dalam mitokondria, aparatus golgi, membran plasma, dan retikulum endoplasma. *Quinone* juga dapat melalui siklus redoks dengan radikal *semiquinon*, yang menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif, termasuk superoksida, hidrogen peroksida dan akhirnya radikal hidroksil (Madeo *et al*, 2013).



2.1.3 Pengaruh Rhodamin B Terhadap Organ Reproduksi

Paparan rhodamin B pada mencit dengan dosis 150 ppm, 300 ppm dan 600 ppm secara oral selama dua siklus estrus, terbukti dapat memperlambat panjang siklus estrus pada mencit betina dewasa (Febrina *et al*, 2013).

Paparan rhodamin B pada tikus wistar dengan dosis 4,5 mg, 9 mg, 18 mg secara oral, yang dimasukkan langsung ke dalam lambung melalui mulut dengan lama paparan 36 hari, dapat berpengaruh terhadap hipotalamus, endometrium dan ovarium, namun pada dosis 18 mg dengan cepat dapat meningkatkan ekspresi BAX (proapoptosis) dan menurunkan ekspresi BCL-2 (protein antiapoptosis) pada jaringan hipotalamus sehingga menurunkan kadar FSH dan LH (Sulistina, 2014). Rhodamin B juga dapat menurunkan kadar 17β -Estradiol, jumlah folikel ovarium dan ketebalan endometrium, serta terjadi peroksidasi lipid sehingga kadar MDA meningkat (Maryanti *et al*, 2014).

2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi untuk mencegah dan menghambat kerusakan sel karena proses oksidatif seperti protein, lemak, dan DNA (Halliwell dan Gutteridge, 2000). Antioksidan berperan sebagai pemulung/scavenger karena berfungsi mencegah kerusakan sel dan jaringan tubuh (Purwaningsih, 2012).

Antioksidan yang ada dalam tubuh dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya sifat oksidan pada metabolisme tubuh, aktivitas dan jumlah antioksidan, serta interaksi dari antioksidan. Antioksidan bekerja dengan cara memutuskan reaksi pembentukan radikal bebas dengan mentransfer atom H, seperti α -tokoferol, mengurangi konsentrasi oksigen reaktif, seperti glutation, sebagai scavenger dalam mengurangi radikal bebas, seperti SOD, dan mampu menjaga kestabilan katalis logam transisi (Fe^{2+} dan Cu^{2+}), contohnya flavonoid dan fenol (Jin-yeum *et al.*, 2010).



Makanan yang mengandung antioksidan mampu membantu tubuh menetralkan radikal bebas. Tubuh manusia secara alami memiliki sistem pertahanan dalam menetralkan radikal bebas. Apabila radikal bebas dalam tubuh berlebihan maka tubuh tidak mampu menetralkan, sehingga dibutuhkan bantuan dari luar berupa antioksidan eksogen (Asmarani, 2015). Antioksidan mudah teroksidasi, sehingga antioksidan akan dioksidasi oleh radikal bebas untuk melindungi molekul lain agar tidak terjadi kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas (Werddhasari, 2014).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen berupa enzim-enzim yang bersifat antioksidan, seperti: *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase (Cat), dan glutathione peroksidase (Gpx). Antioksidan eksogen didapat dari luar tubuh, seperti dari makanan antara lain vitamin C, vitamin E, vitamin A, organosulfur, senyawa fitokimia (*α -tocopherol*, *flavonoid*, *thymoquinone*, statin, niasin, *phycoyanin*). Daun katuk, minyak zaitun, buah naga, ekstrak daun manggis, daun jambu biji, kulit nenas, dan kulit batang ketapang termasuk juga sebagai sumber antioksidan alami (Werddhasari, 2014).

2.3 Zaitun (*Olea europaea*)

2.3.1 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Zaitun (*Olea europaea*)

Zaitun memiliki nama ilmiah *Olea europaea* yang termasuk dalam famili *oleaceae*. Pohon zaitun menghasilkan buah pada usia lima tahun. Pada umur 15-20 tahun pohon zaitun dapat memproduksi buah secara penuh dan dapat bertahan hidup hingga ratusan tahun. Buah zaitun muda yang berwarna hijau kekuningan sering digunakan sebagai bumbu penyedap masakan oleh masyarakat mediterania. Buah yang matang berwarna ungu kehitaman diperas untuk diambil minyaknya yang dikenal dengan minyak zaitun. Minyak zaitun



dikenal sebagai minyak yang sehat karena memiliki kandungan lemak tak jenuh yang tinggi, asam oleik dan polifenol (Fehri et al, 1996).

Pohon zaitun umumnya berbentuk perdu hijau. Batang pohonnya berukuran pendek besar tingginya jarang melebihi 8-15 m, kecuali varietas *Pisciottana* yang lebih besar dan tinggi. Batangnya memiliki diameter yang cukup besar dan biasanya berlekuk-lekuk (keriput dan terpelintir), memiliki cabang yang lentur, kulit kayu berwarna abu-abu pucat (Ali et al, 1982).



Gambar 2.2 Pohon zaitun (Hasmi et al 2015)

Keterangan: Pohon zaitun memiliki batang yang pendek dan berwarna keabu-abuan

Berdasarkan ilmu taksonomi, klasifikasi tumbuhan zaitun (*Olea europaea*) sebagai berikut (Hasmi et al 2015):

Kingdom : *Plantae*
 Filum : *Magnoliophyta*
 Kelas : *Rosopsida*
 Ordo : *Lamiales*
 Famili : *Oleaceae*
 Sub-famili : *Oleidae*
 Genus : *Olea*



Spesies : *Olea europaea*

Sub-spesies : *Cuspidate*

Laperrinei

Maroccana

Cerasiformis

Guanchica

Europaea

Daun tanaman zaitun berwarna hijau perak, termasuk daun tunggal berbentuk lonjong seperti papan selancar dan kasar. Panjang daun zaitun sekitar 4-10 cm dan lebarnya 1-3 cm, tangkai daun 5 mm. Permukaan bagian atas berwarna hijau sedangkan permukaan bagian bawah berwarna hijau muda agak keputihan (Ali *et al*, 1982).

Bunga zaitun adalah bunga hermaphrodit atau berkelamin tunggal (bunga sempurna dan tidak sempurna) dan buahnya menumpang. Bunga zaitun ini sangat banyak, berukuran kecil-kecil, berwarna putih serta memiliki bulu. Buah zaitun berukuran kecil seperti sebuah batu dan panjangnya sekitar 1-2,5 cm dengan biji memiliki endosperma. Buah zaitun pada tanaman liar lebih kurus dan kecil dibandingkan dengan buah zaitun yang dibudidayakan. Tanaman akan berbuah ketika berumur 5 tahun (Sarwar, 2013).



Gambar 2.3 Buah zaitun (Hasmi et al, 2015).

Keterangan: Buah berwarna hijau merupakan buah yang masih muda, sedangkan buah yang berwarna ungu kehitaman merupakan buah yang sudah masak sering diolah menjadi minyak zaitun.

Zaitun (*Olea europaea*) termasuk keluarga *Oleaceae* atau dikotil, meliputi 30 genus pohon gugur dan semak belukar termasuk pohon zaitun itu sendiri dan kerabatnya yang berjumlah sekitar 600 spesies. Keluarga *Oleaceae* tersebut dibagi menjadi beberapa suku, yaitu *Fontanesieae*, *Forsythieae*, *Jasmineae*, *Myxopyreae*, dan *Oleeae*. Tanaman tersebut sebagian besar berasal dari semua benua kecuali Antartika, termasuk daerah tropis, subtropis, dan daerah beriklim sedang dunia. *Oleaceae* paling baik ditanam di Asia dan Malaysia terutama daerah tropis dan beriklim di Asia. Genus *Olea* namanya didapatkan dari bahasa Yunani "*elaia*" dan Latin "*oleum*", dengan 80 nama yang berbeda. Genus *Olea* terdiri dari 30 spesies, tetapi *Olea europaea* L. adalah anggota paling populer dari genus *Olea*. Ini adalah satu-satunya spesies genus yang digunakan sebagai makanan dan ditemukan di wilayah Mediterania (Hasmi et al, 2015).

Pohon zaitun biasanya terdapat di daerah pesisir Mediterania bagian timur, daerah pesisir yang berdekatan Eropa tenggara, Iran utara di ujung selatan Laut Kaspia, Asia barat, dan Afrika bagian utara. Pohon zaitun dan buahnya juga terdapat dalam konteks agama. Zaitun diceritakan beberapa kali di dalam Alkitab dalam Perjanjian Baru dan Lama. Zaitun juga disebutkan dalam Alquran sebagai pohon dan buah yang diberkati. Zaitun tidak dikonsumsi sebagai buah segar



karena rasanya sangat pahit, sehingga zaitun dikonsumsi dalam bentuk minyak zaitun atau olahan buah zaitun (Hasmi *et al.*, 2015).

Pemetikan zaitun biasanya dilakukan antara pertengahan November dan pertengahan Januari. Zaitun dikumpulkan dalam jala yang ditempatkan di seputar kaki pohon. Dalam jangka 24 jam setelah pemetikan, zaitun diangkat langsung menuju kilang untuk diperas minyaknya. Perasan terhadap buah zaitun yang utuh menghasilkan semacam pasta. Biasanya dilakukan dengan bantuan batu giling granit atau baja yang bentuknya hampir tidak berubah sejak 1.000 tahun yang lalu. Selanjutnya pasta digelar di atas alas tipis, yang kemudian ditumpuk dan ditaruh dalam mesin peras. Mesin ini melakukan tekanan sebesar beberapa ratus pon dan pasta itu akan mengeluarkan minyak dan air yang merembes melalui alas tipis itu tadi, lalu menetes ke dalam tabung – tabung penampung. Proses ini tidak membutuhkan panas, dari sinilah munculnya istilah minyak zaitun yang “pertama diperas dingin”. Metode perasan dingin berarti zaitun dan mesin perasnya tidak dipanaskan atau dicelup ke dalam air panas.

Suhu maksimum yang diperkenankan untuk *Extra Virgin Olive Oil* adalah 25°C atau 77°F. Panas bisa memberi hasil minyak lebih banyak ketika diperas tetapi dapat merusak kualitas dan rasa. Perasaan dingin ini adalah satu-satunya perasaan yang dilakukan. Zaitun nyaris tidak pernah diperas dua kali dengan tekanan yang lebih besar, hal ini hanya akan mengeluarkan cairan pahit dari biji.

Sisa minyak dalam buah dipancing keluar dengan air panas atau pelarut organik. Minyak tersebut menghasilkan kualitas yang lebih rendah dan tidak dapat diberi label “*extra virgin*” (Orey, 2008)

2.3.2 Jenis-jenis Minyak Zaitun

Secara umum, minyak zaitun dibagi menjadi 2 kategori yaitu melalui proses pemurnian (*refined*) dan mentah (*unrefined*). Jenis *virgin* dan *extra virgin olive oil* tergolong ke dalam kategori mentah (*unrefined*), sementara minyak zaitun yang



biasanya berlabel *light* atau *pure olive oil* telah mengalami proses pemurnian (Dewi, 2016).

Berdasarkan jenisnya minyak zaitun dibagi menjadi:

- a) *Extra Virgin Olive Oil*: berasal dari perasan pertama dengan metode *cold press* sehingga buah zaitun tidak melalui proses pemanasan dan tanpa bahan kimia. Menggunakan buah zaitun yang berkualitas, *Extra Virgin Olive Oil* memiliki kandungan vitamin, antioksidan dan mineral yang masih alami dan lengkap sehingga dapat dikonsumsi langsung. *Extra Virgin Olive Oil* berwarna kehijauan, memiliki bau dan citarasa yang khas, memiliki kandungan asam oleat kurang dari 0,8%.
- b) *Virgin Olive Oil*: hampir sama dengan extra virgin olive oil, minyak ini diambil dari perasan kedua buah zaitun dan memiliki kandungan asam oleat dibawah 1,5%.
- c) *Refined Olive Oil*: Berasal dari hasil penyulingan, memiliki tingkat keasaman lebih dari 3,3%. Memiliki bau dan rasa yang kurang menarik.
- d) *Pure Olive Oil*: Minyak ini memiliki bau dan rasa lebih ringan daripada virgin olive oil, paling banyak dijual di pasaran.
- e) *Extra Light Olive Oil*: Kualitasnya kurang begitu baik karena terbuat dari campuran minyak zaitun murni dan hasil sulingan.

2.3.3 Kandungan *Extra Virgin Olive Oil*

Buah zaitun merupakan sumber antioksidan alami. Banyak memiliki senyawa fenolik, terutama *secoiridoids* dan *iridoids* serta aktivitas farmakologisnya menjadi perhatian para ilmuwan dalam dekade terakhir. Zaitun banyak dieksplorasi sebagai makanan fungsional dengan berbagai macam *biophenol* dan komponen bioaktif lainnya (Asmarani, 2015).

Buah *Olea europaea* mengandung cukup banyak fenol seperti *hidroksitirosol* dan turunannya, *flavonoid*, *secoiridoids*. Beberapa turunan



hidroksitiroso adalah *hidroksitiroso rhamnosida*, *hidroksitiroso glukosida* dan *metil malat- β - hidroksitiroso*. Minyak zaitun kaya akan sumber senyawa *biophenolic* dan memiliki banyak sifat biologis yang menarik. Penemuan adanya *hidroksitiroso*, *hidroksitiroso asetat* dan *3,4-dihidroksifenilil - [(2,6-dimetoksi-3-etilidena) tetrahidropiran-4-yl] asetat* terdapat dalam EVOO (*Extra Virgin Olive Oil*) dan minyak zaitun (Hasmi *et al*, 2015).

Le Tutour dan Guedon menyelidiki aktivitas antioksidan *oleuropein*, *hydroxytyrosol*, dan *tiroso* dari daun *O. europaea* dibandingkan dengan vitamin E. *Oleuropein* dan *hidroksitiroso* menunjukkan kandungan aktivitas antioksidan yang tinggi (Hasmi *et al*, 2015).

Syringol dan *syringaldehida* termasuk di antara senyawa volatil yang paling melimpah dan *oleuropein*, *hydroxytyrosol*, *syringaldehida*, dan *tiroso* adalah *fenolat* paling melimpah yang diidentifikasi oleh HPLC. Empat senyawa fenolik utama yang terdapat dalam minyak zaitun, yaitu *hidroksitiroso*, *oleuropein*, *hidroksitirosolelenolat* dan asam *dihidroksifenilena elenolik dialdehida*, secara signifikan memberikan efek perlindungan terhadap sel darah merah melawan kerusakan oksidatif (Hasmi *et al*, 2015).

2.3.4 Manfaat Extra Virgin Olive Oil

Menurut hasil penelitian Meilina (2017), menyatakan bahwa pemberian EVOO secara oral mampu menurunkan kadar MDA kelompok kontrol secara signifikan yang diujikan pada tikus Wistar jantan. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Nugraheni (2012) didapatkan hasil bahwa pemberian EVOO mampu menurunkan kadar trigliserida pada hewan coba.

Pada pengobatan tradisional minyak zaitun secara terapeutik dapat juga mengurangi gula darah, kolesterol, asam urat, untuk mengobati diabetes, hipertensi, radang, diare, infeksi saluran pernapasan dan saluran kemih, perut



dan usus penyakit, asma, wasir, rematik, pencahar, mulut pembersih, dan sebagai vasodilator (Asmarani, 2015).

Menurut Sancez *et al* (2011), dosis normal dalam mengkonsumsi EVOO adalah 25-40 ml atau 8-70 gram per hari, efek samping yang terjadi adalah alergi kulit. Konsumsi EVOO dosis 30 ml bisa digunakan sebagai obat pencahar, sedangkan konsumsi di atas 30 ml memberi efek samping diare.

2.4 Ovarium

2.4.1 Pengertian Ovarium

Ovarium merupakan bagian dari alat reproduksi. Ovarium adalah badan berbentuk buah almond berwarna putih suram yang panjangnya sekitar 4 cm.

Selama usia reproduksi, panjangnya 2,5-5 cm, lebar 1,5-3 cm, dan ketebalan 0,6-1,5 cm. Ovarium berada di sebelah posterior dan lateral dari korpus uterus

dan di bawah tuba uterina. Posisinya juga bervariasi, biasanya terletak di bagian atas rongga pelvis dan bersandar di cekungan dangkal di dinding lateral pelvis.

Fossa ovaria Waldeyer ini terletak diantara pembuluh darah iliaka interna dan eksterna yang menyebar (Cunningham, 2012).

Ovarium terikat dengan ligamentum latum oleh mesovarium. Ligamentum uteroovarian meluas dari bagian lateral dan posterior uterus, tepat dibawah insersi tuba, ke kutub uterus ovarium. Biasanya memiliki panjang beberapa cm dan diameter 3-4 mm. Ovarium ditutupi oleh peritonium dan terdiri dari otot dan jaringan ikat. Ligamentum infundibulopelvik atau ligamentum suspensorium ovari meluas dari bagian atas atau kutub tuba ke dinding pelvis, yang terdapat pembuluh darah dan saraf ovarium di dalamnya (Cunningham, 2012).

Ovarium dipersarafi oleh saraf simpatik dan parasimpatik. Saraf simpatik terutama berasal dari pleksus ovarikus yang mendampingi pembuluh darah ovarium. Yang lainnya berasal dari pleksus yang mengelilingi cabang ovarium



arteri uterina. Ovarium banyak dipersarafi oleh serat-serat saraf non-mielin, yang sebagian besar mendamping pembuluh darah (Cunningham, 2012).

Ovarium terdiri dari korteks dan medula. Pada wanita muda, bagian terluar korteks berbentuk halus, mempunyai permukaan putih yang tidak tajam dan terbentuk tunika albuginea. Pada permukaannya terdapat selapis epitel kubcid, epitel germinal Waldeyer. Korteks mengandung oosit dan folikel yang berkembang. Medula adalah bagian tengah, yang terdiri dari jaringan ikat. Terdapat banyak arteri dan vena di medula dan sejumlah kecil serat-serat otot polos (Cunningham, 2012).

2.4.2 Tahap Perkembangan Folikel

Tahap perkembangan folikel yang berada di ovarium, mulai dari folikel imatur (primordial) yang akan berkembang menjadi folikel matur atau preovulasi (folikel degraaf). Jumlah total folikel dalam ovarium wanita pada saat lahir sekitar 400.000, tapi kemudian sebagian akan mengalami proses degeneratif (atresia) selama masa reproduksi. Regresi jumlah folikel ini sudah dimulai sejak sebelum kelahiran dan berlanjut sepanjang kehidupan reproduksi. Setelah menopause hanya ada sejumlah kecil folikel yang tersisa. Hal itu disebabkan karena hanya satu ovum yang dilepaskan oleh ovarium pada setiap siklus menstruasi dan masa reproduksi wanita, sehingga total jumlah ovum yang dapat dilepaskan adalah 450. Sedangkan pada folikel lain dengan oositnya tidak menjadi matang, berdegenerasi dan menjadi atretik (Cunningham, 2012).

Pada wanita sel germinativum primordial berdiferensiasi membentuk oogonia, terjadi pembelahan mitotik sehingga pada bulan ke-3 sel ini tersusun pada kelompok dikelilingi oleh lapisan sel gepeng. Oogonia sebagian besar terus membelah sampai dengan mitosis, tetapi beberapa diantaranya berdiferensiasi menjadi oosit primer. Segera setelah terbentuk, sel ini melipatgandakan DNANYa dan memasuki tahap profase pembelahan meiosis pertama. Jumlah total sel



germinativum di ovarium mencapai puncaknya diperkirakan berjumlah 7 juta (Sadler, 2014).

Wanita mengalami menstruasi secara teratur. Siklus tersebut diatur oleh hipotalamus. Hipotalamus memproduksi *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH), yang bekerja pada sel lobus anterior (adenohipofisis) atau kelenjar hipofisis, yang selanjutnya akan mensekresi hormon gonadotropin. Hormon gonadotropin terdiri dari *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), mengatur terjadinya perubahan siklus di dalam ovarium (Sadler, 2014).

Terdapat cadangan folikel yang tumbuh dan dipertahankan oleh pasokan folikel primordial pada masa pubertas. Setiap bulannya, 15 hingga 20 folikel tahap primer (pra antral) dirangsang untuk tumbuh dibawah pengaruh hormon FSH dan mulai mencapai kematangan ditandai dengan oosit primer mulai membesar, sementara sel folikuler yang mengelilinginya (dari sel gepeng) berubah menjadi sel kuboit dan berproliferasi membentuk epitel yang bertingkat yakni sel granulosa (folikel primer). Sel granulosa dan oosit mengeluarkan suatu lapisan glikoprotein pada permukaan oosit sehingga membentuk zona pelusida.

Sel ini terus berkembang sehingga terbentuk lapisan sel sekretori (sel teka interna) dan lapisan sel jaringan ikat yang mirip fibroblast (sel teka eksterna).

Ruangannya yang terisi cairan ini saling bergabung sehingga terbentuk antrum, sehingga disebut sebagai folikel sekunder. Antrum ini berbentuk bulan sabit dan makin lama makin membesar, sel granulosa yang ada disekitar oosit masih tetap utuh dan membentuk kumulus oofarus. Folikel sekunder semakin lama semakin matang sampai diameter 10-15 mm yang dikenal dengan folikel tersier, atau folikel matur, folikel de graaf yaitu folikel yang mendekati ovulasi yang dibawah pengaruh FSH dan LH (Sadler, 2014).

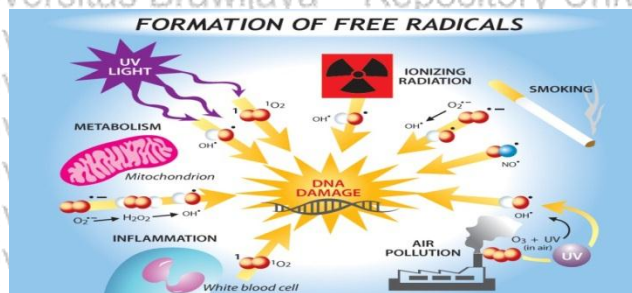
Pada umumnya hanya satu ovum yang dilepaskan oleh ovarium pada setiap siklus menstruasi yang lainnya mengalami degenerasi dan atretik. Masa reproduksi wanita berlangsung 30-40 tahun, maka jumlah total ovum yang dapat dilepaskan adalah 450 sampai 500 yang akan diovulasikan (Sadler, 2014).

2.5 Radikal Bebas, Stres Oksidatif, *Malondialdehyde* (MDA)

2.5.1 Radikal Bebas, Stres Oksidatif, *Malondialdehyde* (MDA)

Radikal bebas merupakan atom yang kehilangan elektron, bersifat tidak stabil dan merusak sel dengan mengambil satu atom hidrogen dari molekul lain tubuh (Kusumastuty, 2014)

Pertemuan dua radikal bebas dapat membentuk ikatan kovalen karena dapat menggunakan elektron tidak berpasangan secara bersamaan. Pada dasarnya molekul secara biologi tidak bersifat radikal, akan tetapi apabila molekul non radikal bertemu dengan radikal bebas maka akan membentuk suatu molekul baru yang bersifat radikal. Ketidakstabilan radikal bebas menyebabkan molekul tersebut bersifat racun dan dapat merusak sel sehingga mengganggu aktifitas DNA, merusak membran dinding sel, mempengaruhi produksi enzim dan hormon dalam tubuh (Werddhasari, 2014).



Gambar 2.4 Sumber pembentukan radikal bebas

Keterangan: Pada pembentukan radikal bebas terdapat dua sumber penting yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internal termasuk metabolisme sel normal misalnya mitokondria, retikulo endoplasma oksidasi serta beberapa aktivitas enzimatik. Sedangkan faktor eksternal seperti radiasi, oksidasi mesin knalpot, karbon tetraklorida, asap rokok dan polusi udara. ROS dapat menyebabkan kerusakan yang serius yaitu kerusakan protein, lipid peroksidase dan kerusakan DNA (Rajendran, 2013)



DNA yang kehilangan elektron karena radikal bebas dapat menimbulkan perubahan struktur DNA sehingga dapat terbentuk sel baru yang mengalami mutasi. Apabila mutasi sel terjadi dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan sel kanker. Proses penuaan termasuk efek dari radikal bebas, karena terjadi pembentukan ROS di mitokondria karena proses inisiasi radikal bebas. Hasil metabolisme tubuh dapat menghasilkan radikal bebas, selain itu asap rokok, sinar ultraviolet, zat kimia beracun dalam makanan dan polutan lain termasuk radikal bebas yang berasal dari luar (Agarwal *et al*, 2012).

Radikal superoksida (O_2^-) yang berasal dari respirasi serta lingkungan diubah oleh enzim superoksida dismutase (SOD) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat reaktif. SOD berasal dari dalam sitosol dan mitokondria.

Peroksida dikatalisis oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase (GP_x). Enzim katalase menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai substrat elektron donor dan satu molekul lagi menjadi substrat elektron akseptor, sehingga dua molekul H_2O_2 menjadi $2H_2O$ dan O_2 . Di dalam eritrosit dan jaringan lain, enzim glutathion peroksidase menggunakan glutathion tereduksi (GSH) mengkatalis destruksi dari H_2O_2 dan lipid hidroperoksida. Proses tersebut bertujuan untuk melindungi lipid membran dan hemoglobin dari serangan oksidasi oleh H_2O_2 agar tidak terjadi hemolisis. GSH akan dioksidasi menjadi GS-SG. Agar GSH selalu tersedia untuk membantu kerja enzim GP_x , maka GS-SG harus direduksi lagi menjadi GSH. Fungsi tersebut diperankan oleh enzim Glutathion reduktase (Gred). H_2O_2 yang tidak dikonversi menjadi H_2O , dapat membentuk radikal hidroksil reaktif (OH^\cdot), apabila bereaksi dengan ion logam transisi (Fe^{2+}/Cu^+). OH^\cdot bersifat lebih reaktif dan berbahaya karena dapat menyebabkan kerusakan sel melalui peroksidasi lipid, protein dan DNA (Agarwal *et al*, 2012).

Dari sekian banyak target biologis dari stres oksidatif, lipid adalah kelas biomolekul yang paling banyak terlibat. Oksidasi lipid memunculkan sejumlah



produk sekunder. *Malondialdehyde* (MDA) adalah produk utama dan paling banyak dipelajari dari peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda. Aldehid ini adalah molekul yang sangat beracun dan harus dianggap lebih dari sekedar penanda peroksidasi lipid. Interaksinya dengan DNA dan protein sering disebut berpotensi mutagenik dan aterogenik (Del Rio *et al*, 2005).

MDA bisa diartikan juga sebagai hasil akhir peroksidasi lipid (terutama PUFA, contohnya fosfolipid LDL) yang digunakan untuk menilai stres oksidatif yang terjadi pada sel dan jaringan (Kusumastuty, 2014). Menurut Malik *et al* (2010), kadar MDA dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya perilaku (merokok, nutrisi dan olahraga), obesitas, faktor patologis (sindrom metabolik, diabetes tipe II dan dislipidemia). Aktifitas fisik yang tinggi akan meningkatkan proses peroksidasi lipid dalam tubuh dibandingkan dengan aktifitas fisik yang rendah (Bouzid *et al*, 2015).

Radikal bebas pada tubuh didapat melalui metabolisme sehari-hari dan akan segera diubah menjadi substansi yang tidak berbahaya bagi tubuh, yaitu H₂O dan CO₂. Reaksi peroksidasi lipid pada akhirnya akan menghasilkan senyawa aldehida salah satunya adalah MDA yang biasa digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan menggambarkan derajat stres oksidatif. Untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid maka dibutuhkan antioksidan untuk menstabilkan radikal bebas sehingga tidak berbahaya bagi tubuh serta serat larut air untuk mengikat lemak sehingga menurunkan kolesterol serum (Winarsi, 2007).

2.5.2 Pengaruh ROS pada Reproduksi Wanita

ROS memiliki peranan yang penting dalam regulasi transduksi sinyal pada *folikulogenesis*, pematangan oosit, korpus luteum, fungsi uterus, *embriogenesis*, implantasi embrio dan perkembangann fetoplasenta (Lazar, 2012). Mitokondria merupakan pusat aktifitas metabolisme di dalam sel, apabila ada gangguan

maka produksi ATP (*Adinin Trifosfat*) juga sangat terganggu, sehingga akan mempengaruhi fungsi gamet tersebut.

ROS memiliki peran penting dalam mengatur proses fisiologis pematangan oosit. ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif sehingga dapat merusak molekul dan struktur sel oosit serta granulosa di dalam folikel (Kala *et al*, 2017). ROS juga dapat berinteraksi dengan lipid, protein dan asam nukleat yang dapat menyebabkan perubahan struktural dan fungsi dalam protein, kerusakan pada asam nukleat (kerusakan pada DNA, membran lipid dan protein) (Tamura *et al*, 2012).

Setiap bulan oosit tumbuh dan membesar di ovarium, tapi yang berhasil sampai tahap meiosis I hanya satu oosit saja yang paling dominan. Proses ini terjadi karena adanya peningkatan ROS dan dihambat oleh antioksidan. Sebaliknya pada proses meiosis II didukung oleh antioksidan, hal ini menunjukkan adanya hubungan yang kompleks antara ROS dan antioksidan di ovarium. Dengan adanya peningkatan produksi steroid oleh folikel yang berkembang menyebabkan peningkatan P-450 yang menyebabkan ROS meningkat. ROS banyak diproduksi dalam folikel dan diperlukan pada proses ovulasi yakni saat pecahnya folikel. Kekurangan oksigen dapat merangsang angiogenesis folikular yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan folikel di ovarium. ROS folikular memicu atresia folikel disebabkan oleh apoptosis sel granulosa, sedangkan GSH dan FSH bertanggung jawab terhadap pertumbuhan folikel. Estrogen meningkatkan respon FSH yang mendukung katalase pada folikel dominan dan mencegah terjadinya apoptosis (Tamura *et al*, 2012; Devine *et al*, 2012).

Ovulasi merupakan hal yang penting dalam reproduksi, dengan lonjakan LH sebagai promotor pada perubahan fisiologis, maka terjadi pelepasan ovum yang matang. Pasca lonjakan LH yang melimpah juga sebagai prekursor dalam



menghasilkan ROS, sebaliknya penurunan kadar prekursor ini mengganggu ovulasi (Agarwal *et al.*, 2012).

Dalam ovarium, ROS juga diproduksi di korpus luteum oleh makrofag. Korpus luteum diproduksi setelah ovulasi dan menghasilkan progesteron yang diperlukan untuk keberhasilan kehamilan dan menjadi faktor kunci dalam reproduksi. Ketika tidak terjadi kehamilan korpus luteum akan surut, sebaliknya jika terjadi kehamilan maka korpus luteum akan tetap ada. Penurunan progesteron yang cepat diperlukan untuk perkembangan folikel yang adekuat pada siklus selanjutnya. Cu/Zn-SOD meningkat dalam korpus luteum selama fase luteal awal sampai menengah dan menurun selama fase regresi (surut).

Aktivitas ini berbanding lurus dengan perubahan konsentrasi progesteron, berkebalikan dengan kadar lipid peroksidase, yang meningkat selama fase regresi. Penurunan kadar Cu/Zn-SOD dapat menjelaskan peningkatan kadar ROS selama regresi (Al-Ghubory *et al.*, 2012).

Peningkatan prostaglandin (PG)F₂-alpha atau makrofag atau penurunan aliran darah ovarium juga dapat menyebabkan penurunan Cu/Zn-SOD. Prostaglandin merangsang produksi anion superoksida oleh sel luteal dan *phagocytic leukocyte* dalam korpus luteum. Penurunan aliran darah ovarium menyebabkan kerusakan jaringan dengan produksi ROS. Kadar Mn-SOD dalam korpus luteum meningkat selama regresi untuk mengikat ROS yang dihasilkan dalam mitokondria melalui reaksi inflamasi dan sitokin. Korpus luteum yang sudah sangat rusak akan menurunkan Mn-SOD. Pada titik ini sel akan mati. Enzim Cu/Zn-SOD sangat berhubungan dengan produksi progesteron ketika Mn-SOD melindungi sel luteal dari inflamasi yang diinduksi stres oksidatif (Agarwal *et al.*, 2012).



2.6 Tikus Putih

2.6.1 Karakteristik Tikus Putih

Tikus putih sudah lama digunakan sebagai hewan laboratorium. Biasanya hewan ini digunakan dalam melakukan penelitian-penelitian (percobaan). Tikus putih ini berasal dari China dan diperkirakan menyebar ke bagian Eropa pada abad 16-18. Tikus adalah hewan mamalia yang berperan penting untuk tujuan ilmiah, karena memiliki daya adaptasi yang baik (Marcondes *et al*, 2002).



Gambar 2.5 Tikus putih.

Keterangan: Tikus albino spesies *Rattus norvegicus*. Jenis galur ini dikembangkan di Institut Wistar tahun 1906. Cirinya: kepala lebar, telinga panjang dan memiliki ekor panjang (Suhardi, 2018).

Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil persilangan sesama jenis yaitu galur *Wistar*, *Long-Evans* dan *Sprague-Dawley*. Galur *Sprague-Dawley* memiliki ciri-ciri kepala yang pendek dan ekor yang lebih panjang daripada badannya dibandingkan dari galur lainnya (Webb *et al*, 2003). Taksonomi tikus putih menurut Musser *et al* (2005), sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*

Filum : *Chordata*

Subfilum : *Vertebrata*

Kelas : *Mamalia*

Ordo : *Rodentia*

Subordo : *Myomorpha*



Famili : *Muroidae*

Subfamili : *Murinae*

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus Norvegicus*

Tikus putih sering digunakan sebagai hewan percobaan. Hewan ini memiliki beberapa keunggulan yaitu penanganan dan pemeliharaannya mudah, dari segi biaya tidak terlalu mahal, umur relatif pendek, sifat reproduksi menyerupai mamalia besar, lama kehamilan singkat, memiliki siklus estrus pendek dan fase setiap siklus jelas (Malole & Pramono 1989).

Secara garis besar, data fisiologis tikus putih dapat dilihat pada berikut ini:

Tabel 2.1 Parameter Normal Fisiologi Reproduksi dan Biologi Tikus (Wolfensohn dan Llyod, 2013).

Parameter	Ukuran Normal
Berat Badan:	
Jantan (gram)	450-520
Betina (gram)	200-300
Lama hidup (tahun)	1-3
Pubertas (hari)	28-49
Tipe siklus estrus	Poliestrus
Lama siklus estrus (hari)	4-5
Estrus (jam)	9-20
Mekanisme ovulasi	Spontan
Lama kebuntingan (hari)	19-20
Lama sapih/ laktasi (hari)	18-21

Tikus memiliki banyak kemiripan, seperti proses biokimia dan biofisika dalam tubuh, memiliki fungsi dan bentuk organ yang hampir sama. Perbedaan antara tikus dan manusia antara lain terdapat pada struktur dan fungsi plasenta tikus, tingkat pertumbuhan tikus yang lebih cepat dari manusia, dan kurang pekanya tikus pada senyawa neurotoksik dan teratogen. Tikus dapat membuat vitamin C sendiri sedangkan manusia hanya memperoleh vitamin C dari

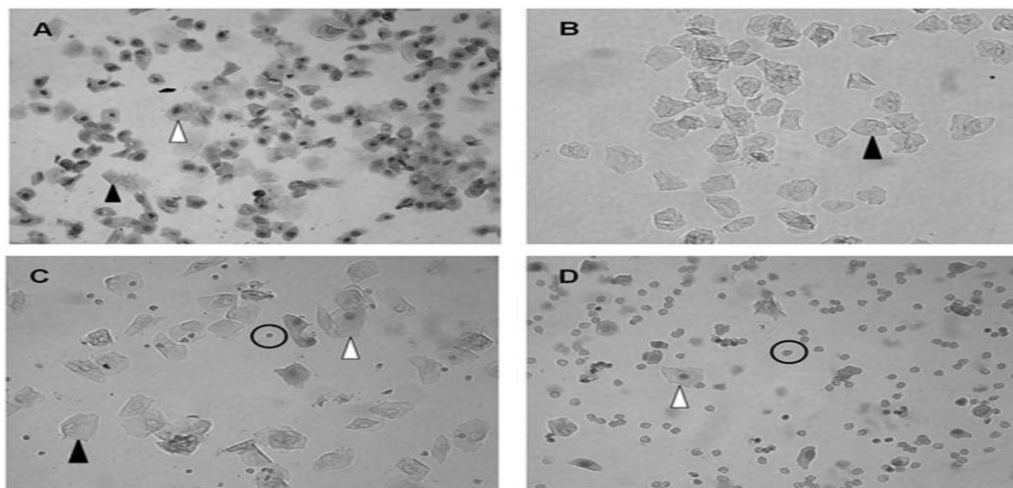


makanan. Berbeda dengan manusia, tikus tidak mempunyai kantung empedu. Sifat-sifat dari tikus yang sudah diketahui dengan sempurna inilah yang menjadikan tikus sering digunakan dalam penelitian (Malole & Pramono 1989).

2.6.2 Siklus Reproduksi Tikus

Tikus mengalami dewasa pada umur 2-3 bulan. Lama kebuntingannya sekitar 20-22 hari, sedangkan masa laktasinya adalah 21 hari. Masa hidup dari tikus putih ini adalah lebih kurang 4 tahun. Dalam aktivitas reproduksinya, tikus mempunyai sifat poliestrus yaitu dalam setahun memiliki siklus berahi lebih dari dua kali. Siklus tersebut dipengaruhi oleh hormon reproduksi selama 4-6 hari.

Siklus berahi pertama timbul setelah 1-2 hari dari mulainya pembukaan vagina yang terjadi pada umur 28-29 hari (Malole & Pramono 1989). Untuk menentukan tahapan deteksi siklus berahi dapat dilakukan dengan teknik *papsmear* (ulas vagina), dengan melihat gambaran epitel vaginanya menggunakan mikroskop sehingga dapat dibedakan menjadi proestrus, estrus, metestrus dan diestrus.



Gambar 2.6 Sitologi vagina tikus pada siklus estrus (Byers *et al.*, 2012).

Keterangan: Tiga jenis sel yang teridentifikasi: leukosit (lingkaran), epitel bertanduk (panah hitam), epitel berinti (panah putih). Tahapan siklus estrus meliputi a. Proestrus, b. Estrus, c. Diestrus, d. Metestrus.

Fase estrus tikus dipengaruhi oleh mekanisme hormonal yaitu hormon hipotalamus hipofisis (GnRH, FSH dan LH), hormon ovarium (estrogen,



progesteron), hormon prostaglandin. Siklus estrus tikus dibagi menjadi fase folikular dan fase luteal. Fase folikular merupakan fase yang singkat diawali dari pembentukan folikel sampai pecahnya folikel de graaf saat ovulasi. Fase luteal terjadi setelah ovulasi dan mensekresi progesteron oleh korpus luteum. Siklus estrus dibagi menjadi 4 stadium yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Fase folikular dimulai dengan fase proestrus diikuti oleh fase estrus dan ovulasi, sedangkan fase luteal terdiri atas metestrus diikuti diestrus dan diakhiri dengan luteolisis (Macmillan dan Burke., 1996).

Fase proestrus merupakan fase menjelang estrus dimana gejala birahi mulai muncul akan tetapi betina belum mau menerima pejantan. Folikel de Graaf tumbuh dibawah pengaruh FSH sehingga menghasilkan estrogen dalam jumlah banyak. Mukosa vagina mulai mendapatkan vaskularisasi yang lebih sehingga sel epitel mulai berproliferasi (Baker *et al*, 1980). Metode ulas vagina digunakan untuk mengetahui fase pada siklus tikus. Fase proestrus diketahui dengan adanya dominasi sel epitel berinti yang muncul secara tunggal atau berlapis, berlangsung selama 12 jam (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Setelah fase proestrus maka dilanjutkan ke fase estrus, ditandai keinginan betina menerima pejantan untuk kopulasi. Estradiol yang berasal dari folikel de Graaf menyebabkan perubahan saluran reproduksi betina (Toelihere, 1985). Fase estrus diketahui dengan banyaknya sel tanduk pada lumen vagina berlangsung selama 12 jam. Proses pembelahan dan penandukan epitel vagina tergantung dari tingginya kadar estrogen dalam tubuh (Baker *et al*, 1980).

Pada fase estrus, estrogen meningkatkan sensitivitas sel-sel penghasil gonadotropin pada hipofisa sehingga menghasilkan LH yang dapat menyebabkan ovulasi ketika kadar LH mencapai puncak (Hafez *et al*, 2000).

Ovulasi terjadi diakhir estrus dan sangat singkat. Setelah ovulasi terjadi, pada ovarium akan mengalami fase luteal, fase luteal adalah fase pembentukan CL



yang dapat menghasilkan progesteron, sedangkan fase metestrus dan diestrus sedang terjadi divagina. Saat CL berukuran maksimal maka akan terjadi peningkatan kadar progesteron (Turner & Bagnara, 1988).

Korpus luteum pada tikus tidak hanya memproduksi progesteron tapi juga memproduksi hormon estrogen, androgen dan hampir semua hormon steroid yang aktif. Pertumbuhan folikel primordial dipengaruhi oleh FSH. Selain itu FSH dan LH mampu mencegah terjadinya folikel atresia (Yu *et al*, 2003).

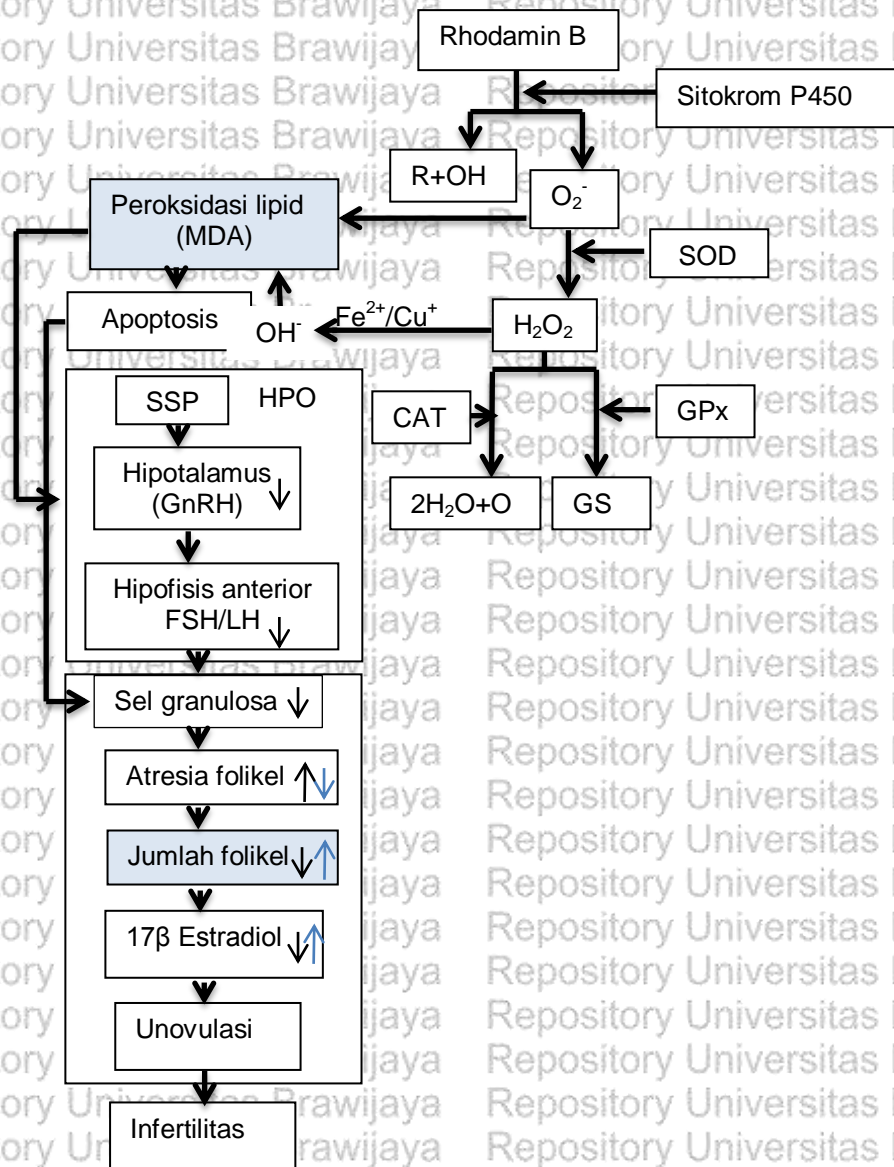
Fase metestrus merupakan kelanjutan dari fase estrus dan berlangsung selama 21 jam (Baker *et al*. 1980). Fase metestrus dibagi menjadi 2 stadium, stadium pertama berlangsung selama 15 jam dan stadium dua selama 6 jam (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pada fase metestrus umumnya tidak terjadi perkawinan. Pada fase metestrus dan diestrus, uterus mengalami fase sekretoris. Selama fase ini uterus terjadi pengendoran otot serta persiapan menerima dan memberi makan embrio sehingga uterus bertekstur lunak

Fase metestrus ditandai dengan adanya dominasi sel tanduk dan sel leukosit saat dilihat menggunakan ulas vagina (Baker *et al*, 1980).

Setelah fase metestrus dilanjutkan fase diestrus. Fase diestrus terjadi selama 60-70 jam dan merupakan fase terpanjang diantara fase lainnya. Pada gambar ulas vagina pada fase diestrus menunjukkan adanya leukosit dalam jumlah yang banyak. Pada fase ini kontraksi uterus menurun, mukosa vagina menipis, endometrium menebal, kelenjar mengalami hipertrofi dan warna lebih pucat (Turner dan Bagnara, 1998).



2.7 Kerangka Teori



Gambar 2.7 Kerangka Teori



2.8 Keterangan Kerangka Teori

Rhodamin B merupakan zat pewarna sintetis yang berbahaya untuk dikonsumsi. Rhodamin yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme oleh sitokrom P450 menghasilkan anion superoksida (O_2^-) dan rhodamin+OH (R+OH).

Enzim SOD (Superoksida Dismutase) akan mengubah anion superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida akan dikatalisis oleh enzim katalase dan GPx. Hasil katalisis hidrogen peroksida dengan enzim katalase adalah H_2O dan O_2 . GPx mengkatalis H_2O_2 menggunakan GSH untuk melindungi serangan oksidasi dalam tubuh.

H_2O_2 yang bereaksi dengan Fe^{2+}/Cu^+ akan menghasilkan radikal hidroksil (OH) yang bersifat reaktif. Anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH) dapat menyebabkan terbentuknya peroksidasi lipid sehingga dapat menyebabkan apoptosis dan kerusakan sel, protein dan DNA.

Peroksidasi lipid yang terjadi pada sistem saraf pusat dapat mempengaruhi hipotalamus sehingga menyebabkan hipofisis anterior dalam memproduksi FSH dan LH menjadi menurun. Penurunan FSH dan LH mempengaruhi perkembangan folikel serta menyebabkan penurunan sel granulosa dan estradiol. Estradiol yang rendah akan menyebabkan terganggunya ovulasi yang akan mengakibatkan terjadinya infertilitas. Peroksidasi Lipid juga dapat menyebabkan apoptosis sel granulosa sehingga terjadi atresia folikel sehingga berdampak pada jumlah folikel normal.

Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas, tapi jika jumlahnya berlebihan maka kemampuan untuk menetralkannya menjadi berkurang.

Sitotoksitas dan kematian sel yang diakibatkan oleh peroksidasi lipid dapat diminimalisasi oleh antioksidan. Oleh karena itu diperlukan antioksidan dari luar tubuh yang dapat diperoleh dengan diet makanan yang mengandung antioksidan. Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan yang penting



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infertilitas menjadi masalah kesehatan di dunia termasuk di Indonesia. Infertilitas tidak mempengaruhi aktivitas jasmani dan tidak mengancam nyawa, namun akan berdampak pada psikis dan medis bagi para pasangan (Hestiantoro *et al*, 2013). Diseluruh dunia 48,5 juta pasangan mengalami infertil, dimana 19,2 juta pasangan mengalami infertil primer dan 29,3 juta pasangan mengalami infertil sekunder. Jumlah pasangan yang menderita infertilitas telah meningkat sejak tahun 1990, ketika 42 juta pasangan tidak dapat memiliki anak (Mascarenhas, *et al*, 2012).

Persentase wanita infertil di Amerika Serikat mengalami peningkatan dari tahun ke tahun dari 8,4% menjadi 10,2% (6,2 juta) dan akan terus bertambah mencapai 7,7 juta pada tahun 2025 (Chandra *et al*, 2013). Kejadian infertil di Indonesia mengalami peningkatan setiap tahun. Pada tahun 2013 didapatkan data prevalensi infertil dari BPS sebesar 15-25% dari seluruh pasangan (Risksedas, 2013). Infertilitas bisa disebabkan oleh suami atau istri. Kejadian infertilitas 20% dari pihak suami disebabkan karena sperma yang tidak normal (jumlah, morfologi, motilitas), gangguan endokrin (gangguan hormonal), kelainan anatomi dan seksual. Sedangkan kejadian infertilitas dari pihak istri menyumbang sebesar 65%, dan 15% kondisi lain-lain dan tidak diketahui (Oktarina *et al*, 2014).

Seorang istri menjadi infertil disebabkan oleh banyak faktor antara lain faktor umur, pekerjaan, berat badan, tingkat stres, disfungsi organ reproduksi diantaranya adalah masalah ovulasi, kelainan tuba dan pelvis, serta kelainan uterus (HIFERI, 2013). Gangguan ovulasi (50,3%) menyebabkan infertilitas (Masoumi *et al*, 2015). Gangguan ovulasi yang terjadi karena adanya gangguan

folikulogenesis sehingga folikel tidak berkembang dan mengalami atresia. Atresia folikel disebabkan adanya apoptosis dan stres oksidatif (Agarwal *et al*, 2012).

Apoptosis disebabkan karena rendahnya kadar estradiol yang mempengaruhi proses ovulasi (Djuwantono *et al*, 2008). Stres oksidatif yang terjadi pada organ-organ poros hipotalamus akan menyebabkan gangguan pada produksi hormon-hormon reproduksi diantaranya GnRH, LH, FSH dan estradiol (Brevini *et al*, 2005).

Stres oksidatif terjadi karena jumlah radikal bebas di dalam tubuh berlebihan. Stres oksidatif bisa disebabkan karena berbagai zat kimia dalam makanan dan lingkungan (Muchtadi, 2013). Penggunaan zat kimia pada makanan yang dilakukan oleh industri pengolahan makanan antara lain untuk pewarna contohnya rhodamin B, metanil yellow, dulsi (pemanis sintesis) dan kalsium bromat (pengeras), boraks dan formalin, serta perasa sintetis (Alsuhendra, 2013). Beberapa pengamatan yang telah dilakukan oleh Astuti, Meikawati dan Sumarginingsih (2010) di desa Bonang, Kecamatan Lasem, Kabupaten Rembang, bahan makanan terasi 70% menggunakan rhodamin B (Alsuhendra, 2013).

Rhodamin B adalah zat pewarna bukan untuk makanan, termasuk kelompok *xenobiotik* bersifat karsinogen dalam tubuh dan dapat meningkatkan radikal bebas (Suciati, 2014). Mengandung senyawa klorin (Cl-), pengalkilasi (CH₃-CH₃), *polycyclic aromatic hidrokarbon* (PAH) mengaktifasi enzim *sitokrom* P-450 serta struktur *quinon* yang sangat *redoks* serta menyebabkan pembentukan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) (Sulistina, 2014). Peningkatan produksi ROS merupakan kondisi terjadinya stress oksidatif. ROS yang bereaksi dengan komponen asam lemak dari membran sel akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga terjadi kerusakan membran sel. Senyawa yang



digunakan sebagai petunjuk aktivitas radikal bebas didalam sel sehingga terjadi stres oksidatif disebut *Malondialdehyde* (Suciati, 2014).

Menurut Suciati (2014), rhodamin B dapat menyebabkan stres oksidatif yang mampu meningkatkan kadar MDA. MDA menyebabkan penurunan jumlah semua jenis folikel ovarium sehingga menyebabkan terjadinya infertilitas. Sitotoksitas dan kematian sel yang diakibatkan oleh ROS dapat diminimalisasi oleh antioksidan dan mekanisme perbaikan di dalam sel.

Antioksidan merupakan zat yang bisa memperlambat atau mencegah kerusakan karena oksidasi, seperti radikal bebas (Devasagayam, 2004). Sumber antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu endogen dan eksogen. Dari dalam tubuh berupa enzim seperti *Superoksida Dismutase* (SOD), *Katalase* (Cat), dan *Glutathione peroksidase* (Gpx). Antioksidan dari luar tubuh antara lain vitamin A, vitamin E, isoflavin, tokoferol. Ada beberapa tumbuhan yang mengandung antioksidan seperti buah manggis, buah naga, daun katuk, kulit nanas, jambu biji, kulit batang ketapang kencana dan minyak zaitun. Salah satu tanaman yang memiliki banyak kandungan polifenol adalah zaitun (Bubonja, 2011).

Pohon zaitun (*Olea europaea*) merupakan salah satu tanaman asli wilayah Mediterania dan bagian Asia kecil. Sebagian besar tanaman *Olea europaea* digunakan secara sebagai obat secara tradisional dalam sistem kedokteran di seluruh dunia. Buah zaitun sekarang sudah tersebar ke seluruh negara dalam bentuk minyak zaitun (Maryem, 2014). Minyak zaitun dalam bentuk *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO) merupakan perasan buah zaitun yang pertama kali diproses sehingga meminimalkan hilangnya kandungan zat gizi (Vossen, 2007).

Menurut penelitian Meilina (2017), EVOO bisa menurunkan stres oksidatif tikus jantan yang dipapar asap rokok. Hal tersebut dikarenakan EVOO memiliki kandungan antioksidan diantaranya polifenol, tokoferol, squalene, pigment dan β -karoten. Antioksidan dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif oleh radikal



bebas. EVOO termasuk dalam golongan antioksidan non-enzimatis yang bersifat preventif dengan merusak pembentukan oksigen yang reaktif (Winarsi, 2007).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin membuktikan tentang pengaruh EVOO terhadap jumlah folikel dan kadar MDA ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.

1.2 Rumusan Masalah

“Apakah EVOO berpengaruh terhadap jumlah folikel dan kadar MDA ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan EVOO dapat meningkatkan jumlah folikel dan menurunkan kadar MDA ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Membuktikan pengaruh EVOO terhadap jumlah folikel tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.
- Membuktikan pengaruh EVOO terhadap kadar MDA ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang pengaruh pemberian EVOO terhadap jumlah folikel dan kadar MDA ovarium bagi yang terpapar rhodamin B.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memotivasi dilakukan penyuluhan kesehatan oleh bidan dan tenaga kesehatan lainnya mengenai EVOO yang dapat dikonsumsi langsung dalam bentuk minyak yang memiliki kandungan antioksidan alami yang dapat mencegah adanya gangguan fungsi

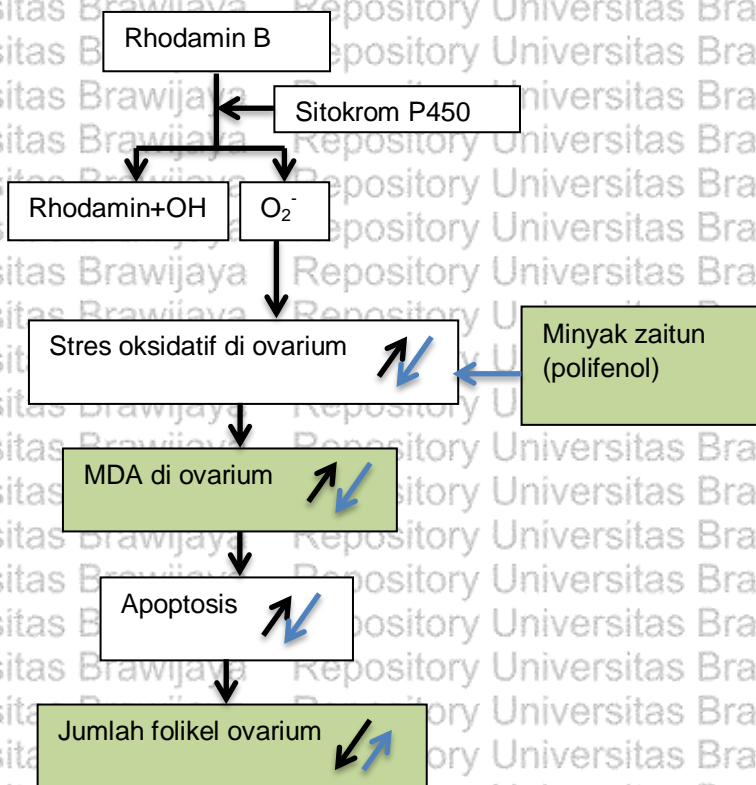




reproduksi dan bermanfaat untuk menurunkan ROS dalam organ
reproduksi yang dapat mempengaruhi fertilitas.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:  : tidak diberikan minyak zaitun
 : diberikan minyak zaitun

Gambar 3.1 Kerangka Konsep



3.2 Keterangan Kerangka Konsep

Rhodamin B adalah zat pewarna, merupakan salah satu kelompok utama xenobiotik di dalam tubuh dan bersifat karsinogenik. Rhodamin B yang masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme oleh enzim sitokrom P-450 yang akan menghasilkan radikal bebas berupa superoksida (O_2^-) dan senyawa rhodamin + OH. Senyawa radikal yang dihasilkan dari metabolisme zat toksik yang berlebihan dapat menyebabkan stress oksidatif dan terjadinya peroksidasi lipid membran sel yang menghasilkan MDA. Bila hal tersebut tidak dicegah maka akan mengakibatkan gangguan fungsi organ ovarium.

Selama proses metabolisme rhodamin B tidak dapat di ekskresi dengan baik, sehingga apabila terakumulasi akan menyebabkan sitotoksitas sampai dengan kematian sel. Tubuh manusia dapat menetralsir radikal bebas ini, tapi jika jumlahnya berlebihan maka kemampuan untuk menetralsirnya menjadi berkurang. Sitotoksitas dan kematian sel yang diakibatkan oleh ROS dapat diminimalisasi oleh antioksidan. Oleh karena itu diperlukan antioksidan dari luar tubuh.

Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan yang penting adalah zaitun. Minyak zaitun mengandung biophenol, salah satu bentuk antioksidan yang penting dan termasuk dalam kategori antioksidan primer.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. EVOO meningkatkan jumlah folikel ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.
2. EVOO menurunkan kadar MDA ovarium tikus betina galur wistar yang dipapar rhodamin B.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Post Test Only Control Group Design*. Eksperimental merupakan penelitian hubungan sebab akibat yang dilakukan terhadap peristiwa karena adanya perlakuan dari peneliti. Salah satu jenis eksperimental adalah *true eksperimental* yaitu rancangan eksperimen yang memiliki tiga syarat meliputi adanya kelompok kontrol, ada random dan ada replikasi. Sedangkan pendekatan *post test only control group design* merupakan salah satu jenis *true experimental*, dimana peristiwa yang terjadi karena adanya perlakuan atau intervensi dari peneliti (respon) hanya diamati setelah perlakuan atau intervensi tersebut diberikan (Zainuddin, 2011).

Pada penelitian ini peneliti menggunakan hewan coba berupa tikus putih galur wistar. Perlakuan atau intervensi yang diberikan oleh peneliti adalah paparan rhodamin B dilanjutkan dengan pemberian EVOO terhadap hewan coba yaitu tikus putih galur wistar yang berkelamin betina. Peristiwa yang terjadi karena perlakuan oleh peneliti yang diamati setelah perlakuan tersebut diberikan, dalam penelitian ini adalah jumlah folikel dan kadar MDA ovarium.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2018 di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Patologi, Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



4.3 Subyek Penelitian dan Replikasi

4.3.1 Subyek Penelitian

Sampel dalam penelitian ini menggunakan hewan coba dengan kriteria inklusi yaitu tikus putih galur wistar, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif. Jenis kelamin betina dengan usia 2-3 bulan. Usia 2-3 bulan ini dikarenakan sistem reproduksi tikus mengalami dewasa pada usia 50 +10 hari atau 60 hari (Kusumawati, 2004; Syamsudin dan Darmono, 2011). Kriteria putus uji dalam penelitian ini adalah tikus putih sakit, hamil pada saat proses penelitian berlangsung.

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi beberapa kelompok diantaranya 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol, yang masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Pembagian kelompok tikus dilakukan secara acak/*Simple Random Sampling*. Pembagian kelompok sampel tersebut adalah sebagai berikut:

- 1)Kelompok kontrol (-) : kelompok tikus yang tidak dipapar rhodamin B, tidak diberikan EVOO.
- 2)Kelompok kontrol (+) : kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/ 200 gr, tidak diberikan EVOO.
- 3)Kelompok perlakuan (1): kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/ 200 gr, diberikan EVOO sebanyak 1,5 ml/KgBB.
- 4)Kelompok perlakuan (2): kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/ 200 gr, diberikan EVOO sebanyak 3 ml/KgBB.
- 5)Kelompok perlakuan (3): kelompok tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/ 200 gr, diberikan EVOO sebanyak 4,5 ml/KgBB.

Dosis rhodamin yang digunakan mengacu pada hasil penelitian Maryanti, *et al* (2014), bahwa dosis 18 mg/200 gr selama 36 hari merupakan dosis yang



memberikan efek terjadinya peningkatan MDA. Sedangkan untuk dosis EVOO menggunakan 1,5 ml/KgBB, 3 ml/KgBB, 4,5 ml/KgBB mengacu pada hasil penelitian Nugraheni (2012) dan Meilina (2017).

4.3.2 Replikasi

Replikasi atau disebut juga sebagai besar sampel dalam penelitian ini merupakan jumlah tikus yang digunakan dalam setiap kelompok sampel penelitian. Replikasi adalah banyaknya unit eksperimen, yang mendapat perlakuan sama pada kondisi tertentu (Zainuddin, 2011). Dalam penelitian ini banyaknya replikasi ditentukan dengan menggunakan rumus (Solimun, 2002; Hidayat, 2011) sebagai berikut:

Rumus Replikasi:

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

Keterangan:

t = banyaknya kelompok

r = jumlah replikasi (banyaknya ulangan) pada tiap kelompok perlakuan

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$r \geq \frac{19}{4}$$

$$r \geq 4,75$$

Berdasarkan rumus di atas maka ditemukan jumlah replikasi adalah 5 dengan hasil yang diperoleh dibulatkan ke atas, untuk menghindari penurunan besar sampel akibat kematian sebesar 20% maka replikasi diperbanyak menjadi 6, sehingga jumlah sampel seluruhnya menjadi 30 ekor.



4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen

Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

4.4.2 Variabel Dependen

Jumlah folikel dan kadar MDA ovarium

4.5 Definisi Operasional

a. *Extra Virgin Olive Oil* (EVOO)

EVOO adalah minyak terbuat dari perasan buah zaitun baik menggunakan alat maupun tidak, dengan metode *cold pressing* sehingga tidak mengubah komposisi asli minyak zaitun. EVOO yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan merk 'Borges'. Diberikan kepada setiap tikus sebanyak 1,5 ml/KgBB, 3 ml/KgBB, 4,5 ml/KgBB. Diberikan satu kali dalam sehari selama 36 hari, secara oral menggunakan spuit yang ujungnya dipasang sonde. EVOO dalam penelitian ini menggunakan skala data rasio.

b. Jumlah Folikel

Pemeriksaan jumlah folikel dilakukan dengan menjumlahkan seluruh jumlah folikel primer, sekunder dan tersier yang terdapat pada sediaan ovarium. Sediaan ovarium yang dipotong secara melintang kemudian dibuat slide histologi, dilakukan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) dan menghitung folikel primer, sekunder dan tersier dengan pengamatan menggunakan kamera Dotslide Olympus BX 51 dengan penampang keseluruhan dan diidentifikasi lebih lanjut dengan pembesaran 400x. Jumlah folikel dalam penelitian ini menggunakan skala data rasio.

c. Kadar MDA

MDA adalah hasil akhir dari peroksidasi lipid digunakan untuk menilai stres oksidatif yang diambil dari jaringan ovarium. Diperiksa



menggunakan metode TBA dengan pemeriksaan spektrofotometri pada panjang gelombang 532 nm. Kadar MDA dalam penelitian ini menggunakan skala data rasio.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pemeliharaan Hewan Coba

a. Bahan

Sekam sebagai alas kandang, pakan standar produk PT comfeed Indonesia, dan air minum untuk hewan coba dari air keran secara adlibitum yang diperiksa setiap hari. Pakan berupa pellet dengan komposisi, dedak, kapur, jagung, tepung tulang, bungkil, minyak, metionin, lisin, garam vitamin dan mineral.

Makanan hewan coba adalah makanan ternak dan minuman hewan coba adalah air.

b. Alat

Hewan coba dipelihara dalam kandang berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm.

c. Prosedur Kerja

1. Persiapan Hewan Coba

Memastikan semua tikus dalam keadaan sehat, berat badan antara 200-300 gr. Tidak hamil dan tidak menopause.

Hewan coba semua diadaptasi terlebih dahulu selama 1 minggu pada ruangan bersuhu kamar (sekitar 22-25°C). Cahaya ruangan bersiklus gelap terang \pm 12 jam, dikontrol tepat jam 12 jam terang (antara 06.00-18.00) dan 12 jam gelap (antara 18.00-06.00). Hewan coba dipelihara dalam kandang (bak plastik) berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang tikus dari kawat berjaring dengan ukuran 36,5 cm x 28



cm x 15,5 cm. Sekam padi digunakan sebagai pelapis dasar kandang dengan tebal 0,5-1 cm dan diganti setiap 3 hari sekali. Tikus diadaptasikan dalam kondisi lingkungan penelitian yang baru dengan diberi pakan standar (Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya) dan minum air secara *ad libitum*.

Pakan standart laboratorium dibuat dari campuran produk pakan ternak dengan tepung terigu dengan perbandingan 3 banding 1. Komposisi yang dipakai terdiri dari tepung terigu, vitamin B1, vitamin B2, asam folat, zat besi dan seng.

Tabel 4.1 Kandungan Pakan Standar

Kandungan	Jumlah
Air	Maksimal 12%
Protein Kasar	12 - 14%
Lemak Kasar	Minimal 4%
Serat Kasar	Maksimal 6%
Abu	Maksimal 7,5%
Kalsium	0,9 - 12%
Fosfor	0,6 - 0,8%

Sumber: Pakan standar yang dipakai di laboratorium Farmakologi FKUB

2. Aklimatisasi Tikus

Aklimatisasi tikus dilakukan selama 15 hari dengan tujuan untuk menjadikan fase tikus menjadi unestrus, tikus bisa menyesuaikan diri dengan lingkungan baru dan menghilangkan stres akibat perpindahan tempat. Tikus dimasukkan dalam kandang tanpa diberi perlakuan tetapi tetap diberikan makan dan minum secara *ad libitum*

3. Sinkronisasi Siklus Estrus

Sinkronisasi siklus tikus dilakukan agar fase tikus sama. Sinkronisasi dilakukan dengan menggunakan efek feromon. Sinkronisasi dilakukan selama 3 hari.



4.6.2 Pemaparan Rhodamin B

a) Bahan: Rhodamin B merk 'sigma-aldrich Pte'.

b) Alat:

Alat untuk membuat larutan rhodamin B adalah gelas ukur, pengaduk, timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 gram, sonde tikus.

c) Prosedur Pemaparan Rhodamin B Pada Hewan Coba

Dosis rhodamin B yang diberikan pada hewan coba sebanyak 18 mg/ 200 gr BB, diberikan per sonde sehari sekali selama 36 hari.

Sebelumnya diberikan serbuk rhodamin B dilarutkan dengan 1 ml aquabidest untuk memudahkan penggunaannya. Lama pemberian rhodamin B pada kelompok perlakuan mengacu pada penelitian Siswati dan Slamet (2000) tentang uji toksisitas subkronik rhodamin B yang diberikan selama 36 hari di luar pemberian pakan yang sesuai standar.

4.6.3 Pemberian *Extra Virgin Olive Oil*

a) Bahan: *Extra Virgin Olive Oil* merk *Borges*

b) Alat:

Alat untuk memberikan EVOO adalah gelas ukur, pengaduk, timbangan analitik dengan ketelitian 0,01 gram, sonde tikus.

c) Prosedur Kerja

EVOO diberikan per oral menggunakan sonde setiap hari satu kali selama 36 hari dan diluar pemberian pakan yang sesuai standar. Dosis yang diberikan adalah 1,5 ml/KgBB, 3 ml/KgBB, 4,5 ml/Kg BB, mengacu pada penelitian Nugraheni (2012) dan Meilia (2017). Pemberian dilakukan setelah 4 jam pemberian rhodamin B. Hal tersebut dikarenakan rhodamin B dan EVOO dalam tubuh tikus membutuhkan fase farmakokinetik di usus.



4.6.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

a) Bahan:

Formalin 10%, methylene blue, alcohol, NaCl 0,9 %,

b) Alat:

Alat bedah minor (scalpel, pinset, gunting, klem, pemegang jaringan), papan untuk meja pembedahan, ketamin, wadah untuk tempat penyimpanan sementara organ sebelum dibuat preparat histologi. Alat untuk swab vagina *cotton bud* (lidi kapas), *cover glass*, *object glass*, *mikroskop*.

c) Prosedur Kerja

Pembedahan dilakukan setelah 36 hari masa perlakuan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1) Disiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, dan tempat organ

tikus, formalin 10%, Injeksi Ketamin 0,2 mg/200 gram tikus secara *intra muscular* (untuk membius tikus) atau dengan dislokasi servikal.

2) Tikus yang sudah tidak bergerak lagi diletakkan diatas alas papan dengan perut menghadap ke atas

3) Tikus ditempatkan pada alas suatu papan dengan menggunakan jarum (*needle*) yang ditancapkan pada ke empat telapak kaki.

Dinding perut dibuka dengan menggunakan pinset dan gunting secara hati-hati, dengan sayatan pada garis tengah dilanjutkan ke samping kanan dan kiri pada sisi atas dan bawah dan diafragma dibuka.

4) Dengan hati-hati mencari ovarium kanan dan kiri tikus, diambil kemudian dipisahkan.

5) Hasil yang didapat dikelompokkan berdasarkan kelompok perlakuan.



- 6) Ovarium kiri kemudian difiksasi menggunakan formalin 10% dikirim ke Laboratorium Patologi Anatomi untuk dibuat preparat histologi dan dilakukan pewarnaan HE untuk kemudian menghitung folikel ovarium
- 7) Ovarium kanan dalam keadaan segar segera dikirim ke laboratorium biomedik untuk pemeriksaan MDA.
- 8) Bangkai tikus yang sudah tidak digunakan dikubur oleh petugas laboratorium.

4.6.5 Pemeriksaan Jumlah Folikel Ovarium

a) Bahan:

- 1) Ovarium
- 2) Formalin 10%
- 3) Etanol 50%, 70%, 80%, 95%
- 4) Etanol Absolute
- 5) Xilene
- 6) Kaset
- 7) Parafin
- 8) Water bath suhu 40 derajat
- 9) Hematoxylin (Leica) Eosin (Merck)
- 10) Tap water

b) Alat:

- 1) Mikrotom
- 2) Objek Glass
- 3) Deckglass
- 4) Mikroskop
- 5) Kamera Dotslide Olympus BX 51

c) Prosedur Kerja

- 1) Pembuatan Preparat Histologi Ovarium



Pembuatan preparat histologi ovarium sesuai dengan standart Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

a) Proses pemotongan jaringan berupa makros

1. Gross (ovarium kiri) hasil bedah dimasukkan ke dalam larutan formalin 10% (fiksasi) semalam.
2. Ovarium dipilih yang terbaik sesuai dengan yang akan diteliti
3. Ovarium dipotong melintang dengan ketebalan $\pm 2-3$ mm.
4. Dimasukkan ke kaset dan diberi kode sesuai dengan kode gross peneliti
5. Dimasukkan ke larutan formalin 10% sebelum diproses/ dimasukkan ke alat Tissue Tex Prosesor.
6. Diproses menggunakan alat/ mesin Tissue Tex Prosesor selama 90 menit.
7. Alarm bunyi tanda selesai

b) Proses pengeblokan dan pemotongan jaringan

1. Jaringan diangkat dari mesin Tissue Tex Prosesor
2. Jaringan diblok dengan parafin sesuai kode jaringan
3. Jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron

c) Proses Deparafinasi

Setelah disayat atau dipotong dengan ketebalan 3-5 mikron, diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu panas 70°C-80°C, kemudian dimasukkan kedalam 2 larutan xylol masing-masing 20 menit. Setelah itu dimasukkan kembali ke dalam 4 tabung alkohol msing-masing 3 menit (hidrasi), terakhir dimasukkan ke dalam air mengalir selama 15 menit.

d) Proses Pewarnaan



1. Cat utama *Harris Hematoksilin* selama 10-15 menit
 2. Cuci dengan air mengalir selama 15 menit
 3. Alkohol asam 1% 2-5 kali celup
 4. Cat pembandingnya Eosin 1% selama 10-15 menit
- e) Dehidrasi

1. Alkohol 70% selama 3 menit
2. Alkohol 80% selama 3 menit
3. Alkohol 90% selama 3 menit
4. Alkohol absolut selama 3 menit

f) Penjernihan (*Clearing*)

Xylol selama 60 menit

g) Mounting dengan entelan dan deckglass

Biarkan slide kering pada suhu ruangan, setelah slide kering siap untuk diamati

2) Pengamatan Preparat Histologi Ovarium

Preparat diamati melalui mikroskop dengan kamera dotslide merek Olympus BX 51 untuk menghitung seluruh jumlah folikel primer, sekunder dan de Graaf pada sediaan ovarium kanan dengan pembesaran 400x.

4.6.6 Pemeriksaan Kadar MDA Ovarium

a) Bahan:

- 1) Ovarium
- 2) MDA kit
- 3) Aquades
- 4) TCA 100%
- 5) HCl
- 6) NaCl



b) Alat:

- 1) Mortar dingin
- 2) Balok es
- 3) Vortex
- 4) Spektrofotometer

c) Prosedur Kerja

MDA merupakan salah satu marker dari peroksidasi lipid. Kadar MDA dalam sampel biologis dapat diketahui dengan metode TBA (*Thiobarbituric Acid Method*). Pembentukan MDA dengan TBA terjadi melalui substitusi nukleofilik dari karbon 5 TBA dan karbon 1 MDA yang diikuti dengan dehidrasi. Intensitas warna merah muda yang dihasilkan menunjukkan banyaknya peroksidasi lipid (Grotto *et al.*, 2009).

Prosedur menghitung kadar MDA pada jaringan sesuai R&D System TBARS Assay Kit dengan catalog number KGE013, dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pembuatan Kurva Standar

Menyiapkan serangkaian pengenceran standar MDA dalam rentang konsentrasi 0 μM -16,7 μM dengan mengencerkan MDA standar dalam suling atau deionisasi air. Semua reagen harus berada pada suhu kamar. Konversikan standar untuk MDA dengan menambahkan 100 μL TBARS standar ke dalam 200 μM TBARS Acid Reagent. Biarkan standar minimal selama 30 menit dengan pengadukan pelan yang akan menghasilkan stock solution 167 μM .

Pipet 900 μM air deionisasi ke dalam tabung 16,7 μM dan 500 μL ke dalam tabung yang tersisa. Gunakan larutan stock solution untuk menghasilkan serangkaian pengenceran dan anti pipet tips setiap



transfer standar. Standar 16,7 μM sebagai standar tertinggi dan air deionisasi sebagai standar 0.

2. Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji *Thiobarbituric Acid* (TBA)

- a) Mempersiapkan 300 μL sampel yang mengandung MDA.
- b) Tambahkan 300 μL TBARS setiap sampel dan standar yang akan diuji.
- c) Aduk dengan rata.
- d) Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu kamar.
- e) Sentrifuse pada $\geq 12.000 \times$ selama 4 menit.
- f) Lepaskan supernatan dari sampel untuk analisa lebih lanjut.
- g) Pengukuran spektrofotometri: transfer 50 μL standar MDA dan sampel ke plat spektrofotometri.

Baca absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

4.6.7 Pembuangan Hewan Coba

Setelah diambil organ ovarium kanan dan kiri, hewan coba (tikus *Rattus Norvegicus* galur Wistar) dikubur dengan kedalaman 50 cm untuk menghindari pencemaran lingkungan.

4.7 Teknik Analisis Data

Pada teknik analisis data dilakukan 4 tahap, diantaranya uji normalitas dan homogenitas data menggunakan uji *Annova One way*, uji korelasi pearson dan analisis regresi. Semua penghitungan dilakukan dengan bantuan piranti lunak (soft ware) dari komputer yaitu SPSS Statistic 23.

4.7.1 Uji Prasyarat Parametrik

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dipilih pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistika parametrik. Sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistika parametrik,

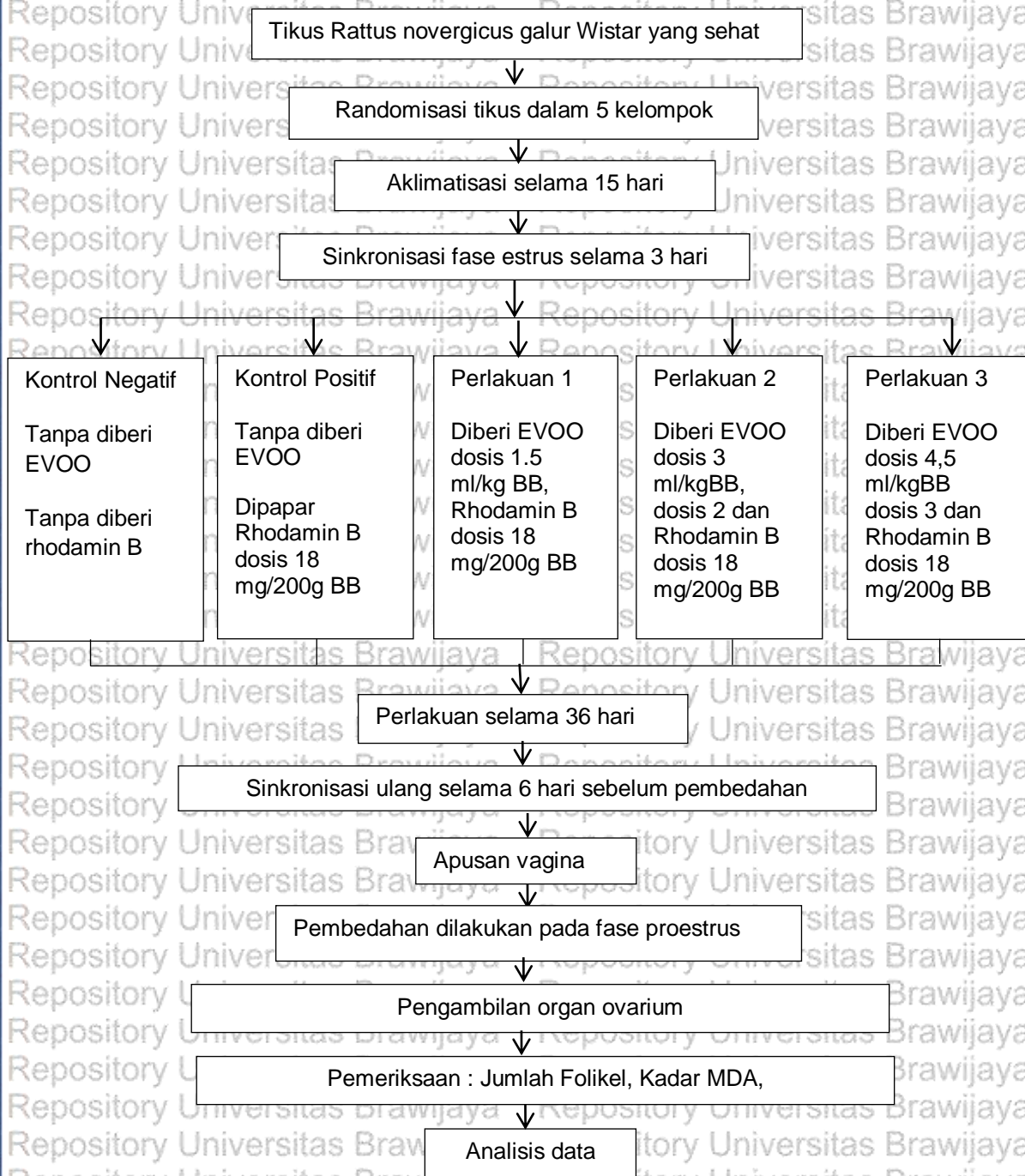


maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau terdistribusi normal. Uji normalitas data dalam penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk. Pada uji ini kriteria keputusan dengan melihat nilai probabilitas kesalahan empirik pada nilai Sig atau dikenal dengan p -value. Jika nilai Sig atau p -value menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, maka disimpulkan data terdistribusi normal, sehingga uji parametrik dapat digunakan. Sedangkan jika nilai Sig atau p -value menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, maka disimpulkan data tidak terdistribusi normal, sehingga uji parametrik tidak dapat digunakan (Santosa, 2005). Adapun variabel terukur yang diuji dengan uji prasyarat parametrik adalah data jumlah folikel ovarium dan kadar MDA.

4.7.2 Uji *One Way Anova*

Uji hipotesis selanjutnya menggunakan *One Way Anova*. Pengujian dengan *One Way Anova* (uji F) digunakan untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok sampel kontrol positif (pemberian rhodamin B) dengan kelompok perlakuan (pemberian rhodamin B dan EVOO). Analisis ini dilakukan yaitu terhadap data jumlah folikel ovarium dan kadar MDA. Tujuan teknik analisis ini adalah untuk mengetahui ada atau tidak ada pengaruh pemberian EVOO berbagai dosis ovarium tikus yang telah diberi rhodamin B sebelumnya. Jika pada uji *One Way Anova* ini menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau kesimpulan ada perbedaan yang bermakna (signifikan), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil/ BNT (*Least Significant Difference/ LSD*) (Steel dan Torrie, 1995). Tujuan digunakan uji LSD adalah untuk menemukan dosis EVOO berapa yang paling berpengaruh terhadap jumlah folikel ovarium dan kadar MDA pada ovarium tikus betina galur Wistar.

4.8 Alur Penelitian



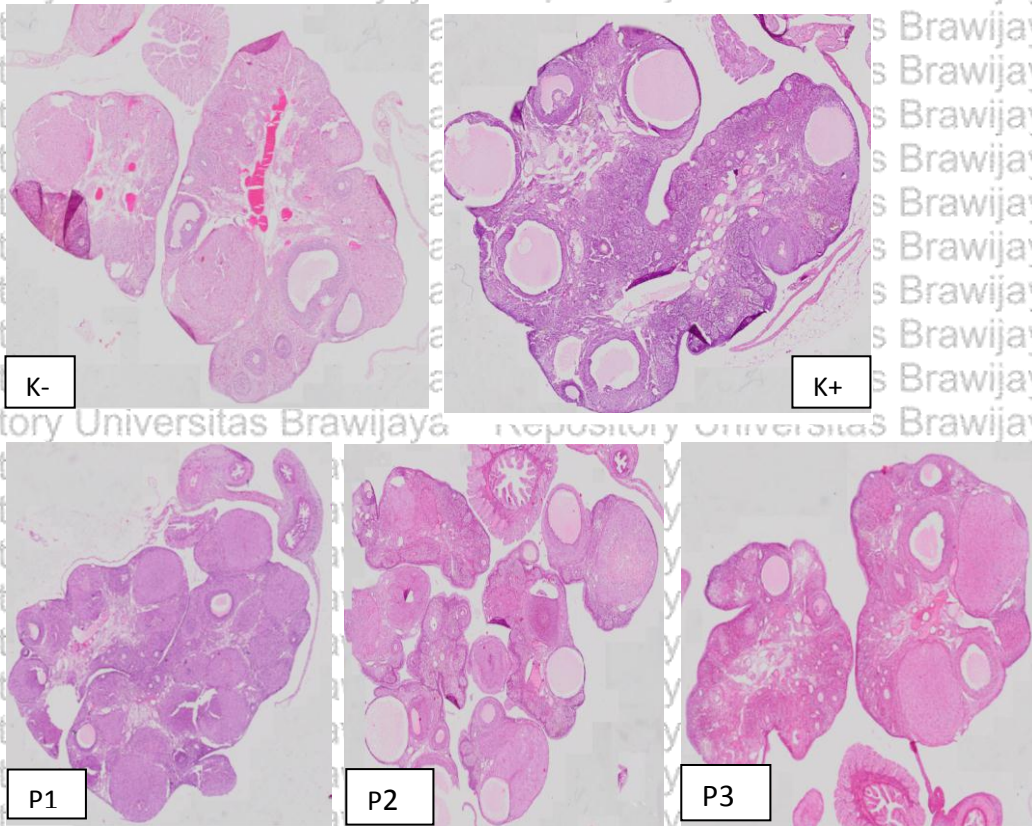
Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

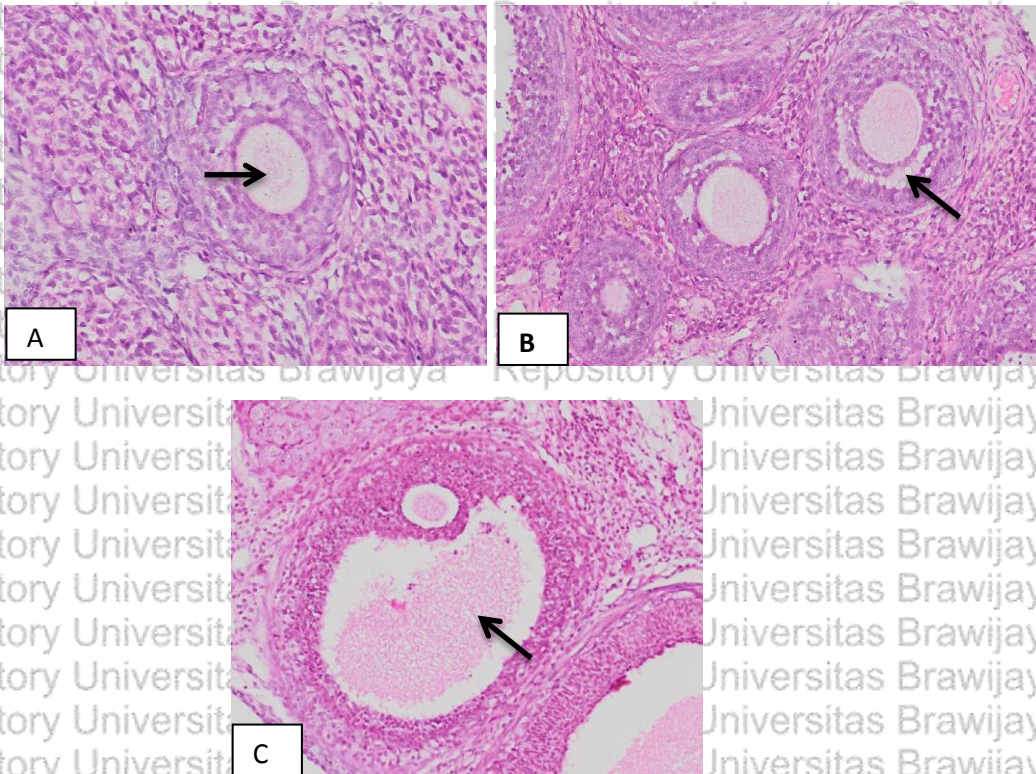
5.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Ovarium

Gambar histopatologi jaringan ovarium didapatkan dengan menggunakan kamera *Dot Slide Olympus BX 51*, pembesaran 400x dengan pewarnaan *Hematoxylen Eosin*.



Gambar 5.1 Histopatologi jaringan ovarium

Keterangan : K- adalah kelompok kontrol negatif yaitu tikus yang sehat tidak dipapar rhodamin B dan tidak diberi EVOO. K+ adalah kelompok kontrol positif yaitu tikus yang dipapar rhodamin B 18 mg/200 gr BB. P1 adalah tikus yang dipapar rhodamin B 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO 1,5 ml/kg BB. P2 adalah tikus yang dipapar rhodamin B 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO 3 ml/kg BB. P3 adalah tikus yang dipapar rhodamin B 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO 4,5 ml/ kg BB perlakuan dilakukan selama 36 hari.



Gambar 5.2 Folikel ovarium

Keterangan : A. Folikel primer, tanda panah menunjukkan bahwa pada folikel primer terdapat ovum sebagai calon embrio, B. Folikel sekunder, tanda panah menunjukkan mulai terbentuk antrum, C. Folikel tersier, sel granulosa lebih banyak dan antrum telah terbentuk.

5.2 Uji Prasyarat Parametrik Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel dan Kadar MDA Ovarium pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Analisis data menggunakan uji statistik parametrik *One-Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Uji *Anova* dapat dilakukan jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Oleh karena itu terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data menggunakan *Saphiro-Wilk Test* untuk menganalisa data terdistribusi secara normal atau tidak. Uji homogenitas data dilakukan menggunakan *Levene's Test* untuk menganalisis data memiliki keragaman yang identik (homogen).



Tabel 5.1 Hasil Uji Prasyarat Parametrik Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel dan Kadar MDA Ovarium pada Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Variabel	Normalitas		Homogenitas	
	Sig.	Ket	Sig.	Ket
Jumlah folikel	0,428	Normal	0,536	Homogen
Kadar MDA	0,791	Normal	0,596	Homogen

Keterangan: Uji normalitas menggunakan *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene's test* dengan taraf signifikansi > 0,05.

Dari tabel di atas, jumlah folikel dan kadar MDA pada uji normalitas data dan homogenitas memiliki nilai signifikansi > 0,05, sehingga data terdistribusi normal dan memiliki ragam data yang homogen.

5.3 Analisis Data Pengaruh EVOO terhadap Jumlah Folikel Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Tabel 5.2 Hasil Uji *One Way Anova* pada Jumlah Folikel Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Kelompok	Rerata(SD)	Signifikansi
KN	2,2±1,92 ^(a)	0,001
KP	1±0,89 ^(a)	
P1	1,8±1,79 ^(a)	
P2	3,17±1,94 ^(ab)	
P3	5,67±1,75 ^(b)	

Keterangan : Uji *One Way Anova* dengan taraf signifikansi < 0,05

Berdasarkan hasil uji *Anova* pada tabel di atas, didapatkan nilai signifikansi pada jumlah folikel adalah 0,001. Nilai signifikansi tersebut lebih kecil dari alpha (0,05) maka H_0 ditolak sehingga terdapat pengaruh EVOO terhadap jumlah folikel. Rata-rata jumlah folikel tertinggi pada kelompok perlakuan P3 5,67±1,75 dan terendah pada kelompok positif 1±0,89. Sedangkan hasil uji lanjut pada tabel di atas menggunakan LSD, dapat diketahui bahwa pada kontrol positif jumlah folikel mengalami penurunan dibandingkan kontrol negatif, tapi secara statistik penurunan tersebut tidak bermakna. EVOO pada kelompok P1 sudah

ada peningkatan jumlah folikel dibandingkan dengan kontrol positif, walaupun secara statistik peningkatannya belum signifikan. Pada kelompok P2 dengan adanya peningkatan dosis EVOO maka jumlah folikel lebih meningkat lagi. Pada P3 terjadi peningkatan jumlah folikel yang bermakna.

5.4 Analisis Data Pengaruh EVOO terhadap Kadar Malondialdehyde Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Tabel 5.3 Hasil Uji *One Way Anova* pada Kadar MDA Ovarium Tikus yang Dipapar Rhodamin B

Kelompok	Rerata (SD)	Signifikansi
KN	13,4±3,76 ^(a)	0,000
KP	13,5±3,16 ^(a)	
P1	13,3±1,93 ^(a)	
P2	10,3±2,39 ^(ab)	
P3	6,7±2,62 ^(b)	

Keterangan : Uji *One Way Anova* dengan taraf signifikansi < 0,05

Berdasarkan tabel di atas, didapatkan nilai signifikansi kadar MDA sebesar 0,001 sehingga signifikansi < alpha (0,05) maka H_0 ditolak, sehingga terdapat perbedaan/pengaruh yang signifikan pemberian EVOO terhadap penurunan kadar MDA. Nilai rata-rata kadar MDA pada P3 menunjukkan nilai terendah yaitu sebesar 6,68±2,62, sedangkan nilai rata-rata kadar MDA pada kontrol positif menunjukkan nilai tertinggi yaitu sebesar 13,46±3,16. Sedangkan hasil uji lanjut didapatkan bahwa pada kontrol positif terjadi peningkatan kadar MDA bila dibandingkan dengan kontrol negatif, namun peningkatan tersebut tidak bermakna secara statistik. Pada kelompok P1, kadar MDA sudah mulai ada penurunan bila dibandingkan dengan kontrol positif, walaupun penurunan tersebut tidak bermakna secara statistik. Pada kelompok P2 terdapat penurunan kadar MDA ovarium dibandingkan dengan P1 seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan. Pada kelompok P3 terdapat penurunan kadar MDA ovarium yang bermakna. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis EVOO yang diberikan maka kadar MDA akan semakin turun.



BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* terhadap Peningkatan Jumlah Folikel Ovarium Tikus Betina Galur Wistar Yang Dipapar Rhodamin B

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan bahwa kelompok kontrol positif yaitu tikus betina yang dipapar rhodamin B (18 mg/200 gr BB) dan tidak diberikan EVOO ($1 \pm 0,89$), menyebabkan penurunan jumlah folikel bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (tikus sehat) ($2,2 \pm 1,92$) walaupun penurunan jumlah folikel tersebut tidak bermakna secara statistik. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Suciati (2014), rhodamin B dapat menyebabkan stres oksidatif yang mampu meningkatkan peroksidasi lipid sehingga menyebabkan kerusakan pada folikel ovarium.

Menurut Agarwal *et al.* (2012), stres oksidatif dapat menyebabkan terjadinya apoptosis sel granulosa sehingga menyebabkan atresia pada folikel.

Hal tersebut mempengaruhi proses folikulogenesis sehingga folikel tidak berkembang yang mengakibatkan terjadinya gangguan ovulasi pada wanita.

Pada kelompok perlakuan yang dipapar rhodamin B dan diberi EVOO berbagai dosis (P1, P2, P3) dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium.

Berdasarkan uji analisa data menggunakan *Annova one way* pada jumlah folikel didapatkan nilai signifikansi $0,001 < \alpha (0,05)$ sehingga dapat disimpulkan bahwa EVOO dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium. Adanya pengaruh peningkatan jumlah folikel pada perlakuan maka dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pada setiap kelompok perlakuan.

Berdasarkan tabel 5.2, kelompok perlakuan P1 yaitu tikus dipapar rhodamin dosis 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO dosis 1,5 ml/Kg BB ($1,8 \pm 1,79$)



sudah mulai ada peningkatan jumlah folikel bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, akan tetapi peningkatan tersebut tidak bermakna secara statistik.

Pada kelompok perlakuan P2 yaitu tikus dipapar rhodamin dosis 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO dosis 3 ml/Kg BB ($3,17 \pm 1,94$), peningkatan jumlah folikel lebih banyak daripada kelompok perlakuan P1. Peningkatan jumlah folikel tersebut seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan.

Pada kelompok perlakuan P3 yaitu tikus yang dipapar rhodamin dosis 18 mg/200 gr BB dan diberi EVOO 4,5 ml/Kg BB ($5,67 \pm 1,75$) memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol negatif ($2,2 \pm 1,92$), kelompok kontrol positif ($1 \pm 0,89$) dan kelompok perlakuan P1 (pemberian EVOO dengan dosis 1,5 ml/Kg BB) ($1,8 \pm 1,79$). Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada peningkatan jumlah folikel pada kelompok perlakuan, seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan.

Pada hasil penelitian tersebut juga didapatkan bahwa kelompok perlakuan P3 (diberi EVOO 4,5 ml/Kg BB) ($5,67 \pm 1,75$) dengan kelompok perlakuan P2 (diberi EVOO 3 ml/Kg BB) ($3,17 \pm 1,94$), menunjukkan ada perbedaan nilai rerata antara kedua kelompok. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada peningkatan jumlah folikel pada 2 kelompok tersebut. Pada perlakuan P2 (pemberian EVOO 1,5 mg/ Kg BB) dan P3 (pemberian EVOO 4,5 ml/kg BB) pada tikus yang dipapar rodamin B mampu meningkatkan jumlah folikel, walaupun peningkatan tersebut tidak bermakna secara statistik.

Rerata jumlah folikel ovarium pada kelompok perlakuan pemberian EVOO, yang terdekat dengan nilai rerata jumlah folikel ovarium kelompok kontrol negatif ($2,2 \pm 1,92$) adalah kelompok perlakuan P2, yakni pemberian EVOO dosis 3 ml/Kg BB dengan nilai rerata ($3,17 \pm 1,94$). Hal ini berarti bahwa perlakuan pemberian EVOO yang dianggap paling optimum pada tikus yang dipapar rhodamin B adalah pada dosis yang kedua yakni pemberian EVOO dosis 3 ml/Kg BB.



Dalam penelitian ini terbukti bahwa EVOO dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium pada tikus yang dipapar rhodamin B. Disisi lain pada pemeriksaan kadar MDA ovarium, pada kelompok kontrol positif dan kontrol negatif tidak terjadi peningkatan kadar MDA secara signifikan. Kemungkinan hal ini bisa disebabkan karena jumlah sampel yang digunakan sedikit.

Terjadinya penurunan jumlah folikel tidak hanya disebabkan oleh stres oksidatif yang ada di ovarium, tapi juga bisa disebabkan oleh adanya stres oksidatif yang terjadi diporos hipotalamus sehingga mengganggu hormon yang mendukung pertumbuhan folikel. Pada penelitian Brevini *et al* (2005), stres oksidatif yang terjadi pada organ poros hipotalamus dapat menyebabkan gangguan pada produksi hormon reproduksi diantaranya GnRH, LH, FSH dan estradiol. Akan tetapi dalam penelitian ini tidak memeriksa terjadinya stres oksidatif di hipotalamus.

Pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium meliputi pertumbuhan oosit, proliferasi sel granulosa, pembentukan antrum, aktivasi reseptor FSH dan LH, pembentukan hormon estrogen hingga oosit diovulasikan (Leung dan Adashi, 2004). Tahap perkembangan dimulai saat folikel primordial menuju arah medula yang lebih lunak. Hal itu memicu selesainya istirahat meiosis oosit dalam folikel primordial dan berkembang menjadi folikel de graaf (Silber, 2015).

Sitotoksitas dan kematian sel yang diakibatkan oleh stres oksidatif dapat diminimalisasi oleh antioksidan dan mekanisme perbaikan di dalam sel. Zat-zat antioksidan yang terkandung dalam EVOO meliputi senyawa fenolik, tokoferol, squalene, pigment dan betakaroten. EVOO diketahui memiliki kandungan polifenol yang tinggi, polifenol dikenal sebagai anti inflamasi, antioksidan dan antikoagulan. Cara kerja antioksidan ini melindungi sel dari kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas. Termasuk dalam golongan antioksidan non



enzimatis yang bersifat preventif dengan merusak pembentukan oksigen yang reaktif (Winarsi, 2007).

Pada hasil penelitian Nugraheni (2012), menyatakan bahwa pemberian minyak zaitun ekstra virgin dapat menurunkan kadar kolesterol total pada tikus secara signifikan sebanyak 15,16% pada dosis 0,5 gr/hari; 29,53% pada dosis 0,7 gr/hari; dan 50,08% pada dosis 0,9 gr/hari. Pada penelitian Martinez *et al* (2016), menyatakan bahwa EVOO memiliki kandungan antioksidan yang kuat yaitu polifenol dan *hydroxytyrosol*. Antioksidan tersebut mampu menurunkan kadar H_2O_2 di sel osteoblastic yang mampu menekan aktifitas pembentukan alkaline phosphatase, mineral sel osteoblastic dan ekspresi gen kolagen tipe 1 dalam pembentukan tulang. Sedangkan pada penelitian Psaltopoulou *et al* (2011), konsumsi EVOO dengan teratur dan dosis tinggi mampu memberikan perlindungan terjadinya kanker ovarium dan endometrium.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian pustaka yang telah diuraikan di atas, maka hipotesis dalam penelitian ini terbukti bahwa EVOO meningkatkan jumlah folikel ovarium tikus betina yang dipapar rhodamin B.

6.2 Pengaruh *Extra Virgin Olive Oil* menurunkan kadar *Malondialdehyde* Ovarium Tikus Betina Galur Wistar Yang Dipapar Rhodamin B

Berdasarkan hasil analisis kadar MDA, menunjukkan bahwa rerata kadar MDA antara kelompok kontrol negatif yaitu tikus sehat ($13,4 \pm 3,76$) dengan kelompok kontrol positif yaitu tikus yang dipapar rhodamin B dengan dosis 18 mg/200 gr BB ($13,5 \pm 3,16$) berbeda, akan tetapi secara statistik perbedaan tersebut tidak bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa tikus yang dipapar rhodamin B terjadi sedikit peningkatan kadar MDA ovarium dibandingkan dengan tikus yang sehat, sehingga dapat diartikan bahwa perlakuan pada tikus yang dipapar rhodamin B dapat meningkatkan kadar MDA.



Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Maryanti, *et al* (2014) bahwa paparan rhodamin B pada tikus wistar dengan dosis 4,5 mg, 9 mg dan 18 mg secara oral yang diberikan langsung kedalam lambung melalui mulut dengan paparan selama 36 hari dapat menyebabkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid yaitu kadar MDA ovarium. MDA adalah produk akhir peroksidasi lipid (Halliwell and Gutteridge, 2007), sebagai produk oksidasi asam lemak tidak jenuh (PUFA) bersifat racun terhadap sel (Tandon, *et al.*, 2005; Grotto, *et al.*, 2009).

Rhodamin B bila dikonsumsi menyebabkan gangguan fisiologis tubuh dan kanker hati (BPOM, 2012). Menurut penelitian Mayori R, *et al.*, (2013), pemberian rhodamin B pada mencit putih jantan umur 3-4 bulan, dengan dosis 3,5 mg, 7 mg dan 14 mg/gr BB per oral selama 7, 14 dan 21 hari dapat memberikan pengaruh pada kerusakan ginjal diantaranya bowman glomerulus mengalami penyempitan, hipertrofi, nekrosis dan serosis tubulus), kerusakan tersebut sesuai dengan semakin tinggi dosis yang diberikan dan lamanya waktu perlakuan.

Rhodamin B memiliki struktur seperti quinone. Quinone merupakan molekul aktif yang sangat redoks dapat menyebabkan terbentuknya ROS sehingga dapat menimbulkan stres oksidatif (Toei, 1987; Kolman dan Roehm, 2005; Madeo, *et al.*, 2013). Stres oksidatif tinggi menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel, merusak membran sel sehingga terjadi kerusakan sel, jaringan atau organ dan penyakit (Agarwal, *et al.*, 2005; Shkolnik *et al.*, 2011).

Rhodamin B merupakan golongan xenobiotik yang terdapat dalam makanan dan menimbulkan efek toksik, xenobiotik dimetabolisme oleh sitokrom P450 (Prakash, *et al.*, 2013) dapat menghasilkan radikal bebas dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid.

Berdasarkan data kadar MDA ovarium menggunakan uji *Anhova one way*, diperoleh hasil bahwa ada perbedaan rerata kadar MDA ovarium pada kelompok



sampel pengamatan, hal ini ditujukan dengan nilai signifikansi $0,000 < p\text{-value}$ $0,05$. Selanjutnya pada uji perbandingan berganda (*Multiple Comparisons*) dengan uji Beda Nyata Terkecil (LSD), menunjukkan ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA ovarium antara kelompok perlakuan P3 yaitu perlakuan dengan pemberian EVOO $4,5 \text{ mg/Kg BB}$ ($6,7 \pm 2,62$) dengan kelompok kontrol negatif ($13,4 \pm 3,76$), kelompok kontrol positif ($13,5 \pm 3,16$) dan kelompok perlakuan P1 ($13,3 \pm 1,93$). Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan, seiring dengan peningkatan dosis EVOO yang diberikan.

Pada kelompok perlakuan P2 yaitu kelompok tikus yang dipapar rodamin B 18 mg/Kg BB dan pemberian EVOO dosis 3 ml/Kg BB ($10,3 \pm 2,39$) dengan kelompok perlakuan P3 ($6,7 \pm 2,62$), menunjukkan ada perbedaan nilai rerata antara kedua kelompok. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada penurunan kadar MDA pada 2 kelompok tersebut. Pada perlakuan P2 (pemberian EVOO $1,5 \text{ mg/Kg BB}$) dan P3 (pemberian EVOO $4,5 \text{ ml/kg BB}$) pada tikus yang dipapar rodamin B mampu menurunkan kadar MDA, walaupun penurunan ini tidak bermakna secara statistik.

Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Meilina (2017), bahwa pemberian EVOO dengan dosis oral 1 cc (1 g/Kg BB) dapat menurunkan kadar MDA pada tikus Wistar jantan yang dipapar asap rokok. Menurut Nakbi *et al* (2010), efek pemberian EVOO pada tikus yang dipapar pestisida menghasilkan penurunan kadar MDA yang bermakna dan peningkatan aktivitas enzim antioksidan.

Nilai rerata kadar MDA ovarium pada kelompok perlakuan pemberian EVOO, yang terdekat dengan nilai rerata kadar MDA ovarium kelompok kontrol negatif ($13,4 \pm 3,76$) adalah kelompok perlakuan P2, yakni pemberian EVOO dosis 3 ml/Kg BB dengan nilai rerata ($10,3 \pm 2,39$). Hal ini berarti bahwa perlakuan



pemberian EVOO yang dianggap paling optimum pada tikus yang dipapar rodamin B adalah pada dosis yang kedua yakni pemberian EVOO dosis 3 ml/Kg BB.

Pada kelompok kontrol negatif ($13,4 \pm 3,76$), kelompok positif ($13,5 \pm 3,16$) dan kelompok perlakuan P1 yaitu kelompok yang mendapatkan pemberian rodamin B dosis 18 mg/ 200 gr BB dan EVOO dengan dosis 1,5 ml/Kg BB ($13,3 \pm 1,93$), menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA ovarium. Bila berdasarkan nilai reratanya tampak ada sedikit penurunan kadar MDA ovarium pada kelompok perlakuan P1 (pemberian EVOO 1,5 mg/ Kg BB) pada tikus yang dipapar rodamin B mampu menurunkan kadar MDA, walaupun penurunannya sangat kecil. Hal ini menjelaskan bahwa pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok perlakuan 1 tersebut hanya sedikit mengalami perbedaan stres oksidatif. Perbedaan kadar MDA tersebut bisa disebabkan karena perilaku tikus yang aktif, obesitas serta nutrisi yang diberikan. Aktifitas fisik yang tinggi akan meningkatkan proses peroksidasi lipid dalam tubuh dibandingkan dengan aktifitas fisik yang rendah (Bouزيد *et al*, 2015).

Menurut penelitian Malik *et al* (2010), kadar MDA dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya perilaku (merokok, nutrisi dan olahraga), obesitas, faktor patologis (sindrom metabolik, diabetes tipe II dan dislipidemia).

Pada kelompok perlakuan yang lain dengan pemberian rodamin B dan EVOO terjadi penurunan yang signifikan. Hal ini memungkinkan bahwa EVOO memiliki sifat antioksidan yang sangat kuat.

Menurut Masella *et al* (2004), senyawa fenolik terbukti memiliki sifat antioksidan lebih tinggi dari vitamin E. Gugus phenol yang terdiri dari gugus hidroksil semakin banyak, menunjukkan kemampuan antioksidan yang semakin baik. EVOO terdiri dari satu atau lebih gugus hidroksil dengan struktur cincin



aromatik. Pada jenis EVOO mengandung paling sedikit dua gugus hidroksil. Konsentrasi phenol pada EVOO bervariasi dari 50 sampai 800 mg/Kg (Vissers *et al.*, 2004).

Produksi ROS dapat terjadi pada proses metabolisme di mitokondria. Produksi ROS yang berlebihan dapat mengganggu fungsi dari mitokondria yang berada di oosit dan embrio. ROS dalam sistem reproduksi dengan jumlah yang normal memiliki peran untuk mengatur proses fisiologis pematangan oosit, tetapi dalam jumlah yang berlebihan dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat merusak molekul dan struktur sel oosit dan granulosa dalam folikel dan juga dapat menyebabkan kerusakan DNA (Tamura *et al.*, 2012).

Reaksi peroksidasi lipid yang disebabkan meningkatnya ROS karena adanya paparan rhodamin B dapat dihambat oleh antioksidan baik didalam tubuh itu sendiri maupun dari luar seperti adanya penambahan antioksidan salah satunya phenol pada EVOO. Psaltopoulou *et al* (2011), EVOO menjadi salah satu antioksidan eksogen yang bermanfaat sebagai kemopreventif pada beberapa jenis kanker, proses karsinogenesis dapat dihambat dengan beberapa mekanisme seperti penghambatan pada proses sintesis DNA, mengurangi produksi ROS, meregulasi siklus sel, mengatur mekanisme proliferasi serta survival sel.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian pustaka yang telah diuraikan di atas, maka hipotesis dalam penelitian ini terbukti bahwa EVOO menurunkan kadar MDA ovarium tikus betina yang dipapar rhodamin B.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah peneliti menggunakan jumlah sampel kecil (n=5) sehingga data yang diperoleh menghasilkan standar deviasi yang besar, hal tersebut dapat mempengaruhi signifikansi hasil. Untuk itu diperlukan jumlah sampel yang besar agar hasil dari penelitian lebih akurat.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. *Extra Virgin Olive Oil* dapat meningkatkan jumlah folikel ovarium tikus betina yang dipapar rhodamin B.
2. *Extra Virgin Olive Oil* dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* ovarium tikus betina yang dipapar rhodamin B.

7.2 Saran

1. Pada penelitian berikutnya dapat dipertimbangkan untuk melakukan penelitian dengan menggunakan jumlah sampel yang lebih besar.
2. Pada penelitian selanjutnya dapat dipertimbangkan EVOO untuk dilakukan uji toksisitas dan uji klinik pada manusia dalam mengurangi adanya stres oksidatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A. Mellado, AA. Premkumar, B.J. Shaman A. Gupta, S. 2012. The Effects of Oxidative Stress on Female Reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- Ali S.I. dan Agricultural Research Council. 1982. *Flora of Pakistan*. Pakistan Agricultural Research Council.
- Al-Ghubory, K.J. Garrel, C. Faure, P. dan Sugino, N. 2012. Roles of Antioxidant Enzymes in Corpus Luteum Rescue from Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress. *Reproductive BioMedicine Online*. (25): 551-560.
- Alsuheindra dan Ridawati. 2013. Bahan Toksik dalam Makanan. Bandung: PT. Remaja Rosda Karya
- Arkhaesi, N. 2008. Kadar *Malondialdehyde (MDA) Serum Sebagai Indikator Prognosis Keluaran pada Sepsis Neonatorum*. Tesis. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis-1 Ilmu Kesehatan Anak Univesitas Diponegoro, Semarang
- Baker, D.E.J. Lindsey, J.R. Weisborth, S.H. 1980. *The Laboratory Rat*. Volume 2, Research Applications. London: Academic Press Inc.
- Bouزيد, M.A. Hammouda, O. Matran, R. Robin, S. Fabre, C. 2015. Influence of Physical Fitness on Antioxidant Activity and Malondialdehyde Level in Healthy Older Adults. *National Library of Medicine National Institutes of Health*. 40(6):582-9.
- Brevini, T.A.L. Zaneto, S.B. Cillo, F. 2005. Effects of Endocrine Disruptors on Developmental and Reproductive Functions. *Current Drug Targets*. 5: 1-10
- Bubonja, S.M. Giacometti, J. Abram, M. 2011. Antioxidant and Antilisterial Activity of Olive Oil, Cocoa and Rosemary Extract Polyphenols. *Food Chemistry*. 127:1821-27.
- Byers, S.L. Wiles, M.V. Dunn, S.L. Taft, R.A. 2012. Mouse Estrus Cycle Identification Tool and Images. *PLOS ONE* 7(4): e35538.
- Chandra, A. Casey, E.C. Elizabeth, H.S. 2013. Infertility and Impaired Fecundity in The United States 1982-2010. Data From The National Survey Of Family Growth. *National Health Statistic Reports*. No.67
- Cicerale, S. Lucas, L. Keast, R. 2010. Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 458-479



Cunningham, F.G. Leveno, K.J. Bloom, S.L.C. Hauth, J.C. Rouse, D.J. dan Spong, C.Y. 2012. *Williams Obstetrics. Pendit, B.U (Penterjemah) Obstetri Williams Volume I, Edisi. 23*. Jakarta: EGC

Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi LPTIK Universitas Andalas.

Rio, A.D.D. Amanda, J. Stewart, B. Pellegrini, A.N. 2005. A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress. *Review Journal Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*

Devasagayam, T.P.A. 2004. Free Radicals dan Antioxidants in Human Health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*. Volume. 52:794-804.

Devine, P. Perreault, S.D. dan Luderer, U. 2012. Roles of Reactive Oxygen Spesies and Antioxidants in Ovarian Toxicity. *Biology Of Reproduction*. 86 (2):27, 1-10.

Dewi, S. 2012. Farmakokinetik. Dilihat tanggal 14 Juli 2017. <http://shintarosalia.lecture.ub.ac.id/files/2012/11/SRDtoxico2farmakokinetik1.pdf>

Djuwantono, T. Hartanto, B. Wiryawan, P. 2008. *Step By Step Penanganan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas dalam Praktik Sehari-hari*. Jakarta: Sagung

Draper, N. dan Smith, H. 1992. *Analisis Regresi Terapan. Edisi Kedua (Terjemahan Bambang Sumantri)*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

Duran, C. Ozdes, D. Bulut, V.N. Tüfekçi, M. Soylak, M. 2011. Cloud Point Extraction of Rhodamine 6g by Using Triton X-100 As Nonionic Surfactant. *Journal AOAC International*. 94, 286–292

Evelyn, C.P. 2009. *Anatomi Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: PT Gramedia.

Febriana, G.A.A.R. Wiratmini, N.I. dan Sudatri, N.W. 2013. Pengaruh Pemberian Rhodamin B terhadap Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus L.*) Betina. 17(1). 21-23.

Fitriani, I.S. 2016. *Pengaruh Pemberian Lycopene terhadap Jumlah, Kualitas Oosit dan Kadar MDA (Malondialdehyde) pada Mencit Betina (Mus Musculus) yang terpapar Nikotin*. ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga.

Martinez, O.G. Bertos, E.D.L. Torrecillas, J.R. Ruiz, C. Milia, E. Lorenzo, M.L. Jimenez, B. Ortiz, A.S. Rivas, A. 2016. Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oil Stimulate Human Osteoblastic Cell Proliferation. *Plos One* 11(3): e0150045. doi:10.1371/journal.pone.0150045



Ghanbari, R. Anwar, F. Alkharfy, K.M. Gilani A.H. Saari, N. 2012. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) : a review. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3291-3340.

Grotto, D. Maria, L.S. Valentini, J. Paniz, C. Schmitt, G. Garcia, S.C., Pumberl, V.J., Rocha, J.B.T., Farina, M. 2009. Importance of The Lipid Peroxidation Biomarkers and Metodological Aspects for Malondialdehyde Quantification. *Quimica Nova* (32). 1: 169-174.

Hafez, B. Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals Edition 7th*. Philadelphia (US): Lippincot William and Wilkins.

Halliwell, B. dan Gutteridge, J.M.C. 2000. *Free Radical in Biology and Medicine. Edition 4th*. New York: Oxford University Press.

Hasan, M. Iqbal. 2012. *Pokok-pokok Materi Statistik 2 (Statistik Inferensial). (Edisi Kedua, Cetakan Ketujuh)*. Jakarta: Bumi Aksara.

Hashmi, M.A. Khan, A. Hanif, M. Farooq, U. dan Perveen, S. 2015. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Hindawi*.

Hestiantoro, A. Soebijanto, S. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas. Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia (HIFERI), Perhimpunan Fertilisasi in Vitro Indonesia (PERFITRI), Ikatan Ahli Urologi Indonesia (IAUI), Dan Perkumpulan Obstetri Dan Ginekologi Indonesia (POGI)*.

Hidayat, A.A. 2011. *Metode Penelitian Kebidanan dan Tehnik Analisa Data*. Salemba Medika. Jakarta.

HIFERI. 2013. *Konsensus Penanganan Infertilitas. Himpunan Endokrinologi Reproduksi dan Fertilitas Indonesia*.

Hu, F.B. dan Malik, V.S. 2010. Sugar Sweetened Beverages and Risk of Obesity and Type 2 Diabetes: epidemiologic evidence. *Physiology and Behavior*. Vol. 100, no. 1, pp. 47–54.

Jin-Yeum, K.J. Russell, N.U. Majid, A. Fiaz, M. dan Shah, A.H. 2010. Antibacterial Activity of Some Medicinal Mangroves Againsts Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72 (2): 167-172.

Kala, M. Shaikh, V.M. Nivsarkar, M. 2017. Equilibrium between Anti-Oxidant and Reactive Oxygen Species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive Medicine and Biology*. 16(1): 28-35

Kumar, S. 2011. Free Radicals and Antioxidants: human and food system. *Advances in Applied Sciences Research*. 2(1): 129-135.

Kusumastuty, I. 2014. Sari Buah Markisa Ungu Mencegah Peningkatan MDA Serum Tikus Dengan Diet Aterogenik. *Indonesian Journal of Human Nutrition, Volume 1 Edisi 1* : 50 – 56



Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press .8, 50, 68.

Kusmayadi, A. Sukandar, D. 2009. *Food Safety and Its Application in Daily Life to Prevent Dangers of Consuming Unsafe Foods and Promote SPFS Farmer's Health*, [Online], Available: http://www.fao.org/TC/spfs/indonesia/detail_en.asp?id=954

Lazar, L. 2012. The Role of Oxidative Stress in Female Reproduction and Pregnancy. Departemen of Obstetric and Gynecology, Semmelweis University Budapest. Hungary.

Ma, Y. Yao, J.N., 1998. Photodegradation of Rhodamine B Catalyzed by TiO₂ Thin Films. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 116A, 167–170.

Macmillan, K.L. dan Burke, C.R. 1996. Effect of Estrous Cycle Control on Reproductive Efficiency. *Journal of Animal Sciences*. 42:307-436

Madeo, J. Zubair, A. dan Marianne, F. 2013. A Review on The Roles Quinones in Renal Disorders. *Springer Plus*. 2: 139

Malik, V.S. Popkin, B.M. Bray, G.A. Despres, J.P. dan Hu, F.B. 2010. Sugar Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease Risk, *Circulation*. Vol. 121, no. 11, pp. 1356–1364.

Malik, V.S. Popkin, B.M. Bray, G.A. Despres, J.P. Hu, F.B. dan Willett, W.C. 2010. Sugar Sweetened Beverages and Risk of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. Vol. 33, no. 11, pp. 2477–2483.

Malole, M.B.M. and Pramono, C.S.U. 1989. *Pengantar Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor: Pusat Antara Universitas Bioteknologi IPB.

Marcondes, F.K. Biachi, F.J. Tanno, A.P. 2002. Determination of The Estrous Cyclephase of Rats : some helpful consideration. *Journal Brazilian Archives Biology and Technology*. 4(1): 600-614.

Maryanti, S. Suciati, S. Wahyuni, E.S. Santoso, S. Wiyasa, I.W.A. 2014. Rhodamin B Triggers Ovarian Toxicity Through Oxidative Stress. *Cukurova Medical Journal* 39 (3); 451-457

Mascarenhas, N.M. Flaxman, R.S. Boerma, T. Vanderpoel, S. Stevens, A.G. 2012. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLOS Medicine Journal*.

Masella, R. Vari, R. D'Archivio, M. Di Benedetto, R. Matarrese, P. Malorni, W. Scazzochio, B. Giovannini, C. 2004. Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cellmediated Oxidation of LDL by Increasing The Mrna Transcription of Glutathione-Related Enzymes. *The Journal of Nutrition*, 134:785-91



Masoumi, S.Z. Parsa, P. Darvish, N.B.S. Mokhtari S. Yavangi M. Roshanaei G.T. 2015. An Epidemiologic Survey on The Causes of Infertility in Patients Referred to Infertility Center in Fatemeh Hospital in Hamadan Iran. *Journal of Reproductive Medicine*. Vol. 13. No. 8. pp: 513-516

Mehrdad, A. Robab H. 2009. Ultrasonic Degradation of Rhodamine B in The Presence of Hydrogen Peroxide and Some Metal Oxide. *Journal Ultrasonics Sonochemistry* 17. 168–172

Meilina. 2017. Extra Virgin Olive Oil Menurunkan Kadar MDA (Malondialdehyde) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar yang Dipapar Asap Rokok. *DiscoverSys/ Intisari Sains Medis*, Volume 8, Number 2: 97-101

Milbury, P.E. dan Richer, A.C. 2011. *Understanding The Antioxidant Controversy: scrutinizing the 'fountain of youth'*. USA: Greenwood Publishing Group.

Muchtadi, D. 2013. *Antioksidan dan Kiat Sehat di Usia Reproduksi*. Bandung: Alfabeta

Mukono, H.J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Nugraheni, K. 2012. *Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia*. Universitas Diponegoro

Nurmasari, R. Astuti, M.D. Umaningrum, D. Khusnaria, D.A . 2014, Kajian Adsorpsi Rodamin B Pada Humin, *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, ISBN : 978-602-0951-00-3

Orey, C. 2008. *Khasiat Minyak Zaitun: resep umur panjang ala mediterania*. Jakarta: Hikmah

Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Mutiara Sumber Widya.

Purnamasari, Dewi, S. Saebani. 2013. *Pengaruh Rhodamin B Peroral Dosis Bertingkat Selama 12 Minggu Terhadap Gambaran Histomorfometri Limpa: studi pada diameter folikel pulpa putih, diameter centrumgerminativum dan jarak zona marginalis limpa tikus wistar*. Tesis Biologi. Semarang: Universitas Diponegoro

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI*. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/hasil/riskesdas2013.pdf>. Diakses pada tanggal 10 Desember 2017

Sadler, T.W. 2014. *Langman Embriologi Kedokteran*. In: Novrianti, D. A. (ed.) *Langman's Medical Embryology*. Jakarta: EGC

Sanchez, F. Fidalgo, S. Qullez, A. 2011. Influence of Extra Virgin Olive Oil Diet Enriched with Hydroxytyrosol in a Chronic DSS Colitis Model. *European Journal of Nutrition*.

Santosa, S. 2005. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional*. Jakarta: EleX Media Komputindo (Gramedia).



Sarwar, M. 2013. "The Theatrical Usefulness of Olive *Olea europaea* L. (Oleaceae Family) Nutrition in Human Health: a review. *Sky Journal of Medicinal Plant Research*. vol. 2, no. 1, pp. 1-4,

Setyohadi, Baskoro, A.D. dan Sigit, M.L. 2006. *Peranan Minyak Zaitun Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol LDL dalam Darah*. Majalah Kesehatan FKUB; Vol.1, no.2

Sigma-Aldrich. 2005. Material Safety Data Sheet. www.sigma-aldrich.com. Diakses 31 Januari 2018

Siswati, P. 2000. *Uji Toksisitas Zat Warna Rhodamin B Terhadap Jaringan Hati Mencit (Mus Musculus) Galur Australia*. (Online). <http://digilib.itb.ac.id/gdl.php?mod=browse&op=read&id=jbptitbpp-gdl-s2-2000-pihsiswa-1841> diakses tanggal 7 Desember 2017.

Smith, J.B. Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis Tikus Laboratorium (Rattus norvegicus)*: 37-57. Universitas Indonesia.

Solimun. 2002. *Multivariate Analysis Structural Equation Modeling*. Malang: Universitas Negeri Malang.

Soylak, M. Unsal, Y. E. Yilmaz, E. Tuzen, M. 2011. Determination of Rhodamine B in Soft Drink, Waste Water and Lipstick Samples After Solid Phase Extraction. *Journal Food and Chemical Toxicology* 49:1796-1799

Steel, Robert, G.D. dan Torrie, J.H. 1995. *Prinsip Dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. (Terjemahan Bambang Sumantri). Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

Suciati, S. 2014. *Pengaruh Paparan Rhodamin B Terhadap Jumlah Folikel Ovarium Dan Kadar Malondialdehyde (MDA) Ovarium Tikus Rattus Norvegicus Galur Wistar*. Tesis. Pascasarjana Universitas Brawijaya

Suhardi. 2018. *Jenis dan Ciri-ciri Tikus Laboratorium*. Kalimantan Timur. <https://hardianimalscience.wordpress.com/animal-science/jenis-dan-ciri-ciri-tikus-labolatorium-with-picture/>. Diakses tanggal 10-8-2018

Sulistina, D.R. Ratnawati, R. Wiyasa, I.W. A. 2014. Rhodamine B Increases Hypothalamic Cell Apoptosis and Disrupts Hormonal Balance in Rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 180-183

Syamsudin dan Darmono. 2011. *Buku Ajar Farmakologi Eksperimental*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Tamura, H. Takasaki, A. Taketani, T. Tanabe, M. Kizufa, F. Lee, L. Tamura, I. Maekawa, R. Aasada, H. Yamagata, Y. dan Sugino, N. 2012. The Role of Melatonin and Antioxidant in The Folikel. *Journal Of Ovarian Research*. 5: 5.



Toelihere, M.R. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Penerbit Angkasa.

Turner dan Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum, edisi keenam*. Surabaya : Airlangga University Press.

Vissers, M.N. Zock, P.L. Roodenburg, A.J.C. Leenen, R. Katan, M.B. Olive Oil Phenols are Absorbed in Humans. *Journal Nutrition*. 2004; 132: 409–417. PMID:11880564

Psaltopoulou, T. Kosti, R.I. Haidopoulos, D. Dimopoulos, M. Panagiotakos, B.D. 2011. Olive Oil Intake is Inversely Related to Cancer Prevalence: a systematic review and a metaanalysis of 13800 patients and 23340 controls in 19 observational studies. *Journal Lipids in Health And Disease*

Vossen, P. 2007. Olive Oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *Hortscience*;42(5):1093-1100.

Webb, A.A. Gowribai, L. Muir, G.D. 2003. Fischer (F-344) Rats Have Different Morphology, Sensorimotor and Locomotor Abilities Compared to Lewis, Longevans, Sprague-Dawley and Wistar Rats. *Behavioural Brain Research*. 15(1-2):143-56

Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* . Vol.3.2.2014: 59-68

Wijaya, D. 2011. *Waspada! Zat Aditif dalam Makananmu*. Yogyakarta: Buku Biru

Winarsi, H. M. S., 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Cetakan 5*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.p.11-37, 49-58, 77-8.

Wolfensohn, S. dan Llyod, M. 2013. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. Edisi ke 4*. Wiley-Blackwell, New delhi.

Yamlean, P.V.Y. 2011. Identifikasi dan Penetapan Kadar Rhodamin B Pada Jajanan Kue Berwarna Merah Muda yang Beredar di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 11 No. 2

Yu, J.X. He, Z.Y. Qi, Y.F. Chi, R.A. Guo, J. Zhan, G. 2011. Regeneration of Rhodamine B Loaded Modified Biosorbent by a Self-Cleaning Eluent: tio2 hydrosol. *Clean* 39, 400–405

Yuliarti, N. 2007. *Awas Bahaya di Balik Lezatnya Makanan*. Yogyakarta: Andi Offset.

Zainuddin, M. 2011. *Metodologi Penelitian Kefarmasian dan Kesehatan*. Surabaya: Unair Press.

