

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI PINANG (*Arecacatechu L.*)
TERHADAP KADAR FSH, LH, ESTRADIOL, EKSPRESI mRNA GEN
RESEPTOR PROGESTERON DAN SIKLUS ESTRUS MENCIT
BALB/C BETINA**

***THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF EXTRACT FROM ARECA NUT SEEDS
(ARECA CATECHU L) ON THE FSH, LH, ESTRADIOL, EXPRESSION OF mRNA
PROGESTERON RECEPTOR GENERAL AND ESTRUS CYCLE BALB/C
FEMALE RATS***

**TETTY RINA ARITONANG S.
P0200314413**



**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI PINANG (*Areca catechu* L.)
TERHADAP KADAR FSH, LH, ESTRADIOL, EKSPRESI mRNA GEN
RESEPTOR PROGESTERON DAN SIKLUS ESTRUS MENCIT BALB/C
BETINA**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

TETTY RINA ARITONANG S.

Kepada

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BIJI PINANG (*Arecacatechu L.*)
TERHADAP KADAR FSH, LH, ESTRADIOL, EKSPRESI mRNA GEN
RESEPTOR PROGESTERON DAN SIKLUS ESTRUS
MENCIT BALB/C BETINA**

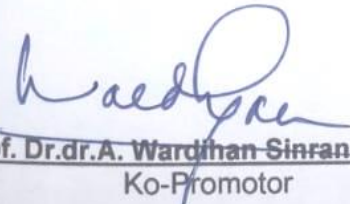
Disusun dan diajukan oleh

TETTY RINA ARITONANG S.
Nomor Pokok P0200314413


telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 29 Agustus 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

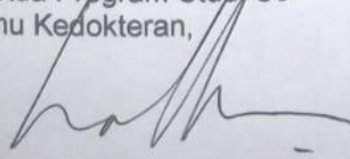
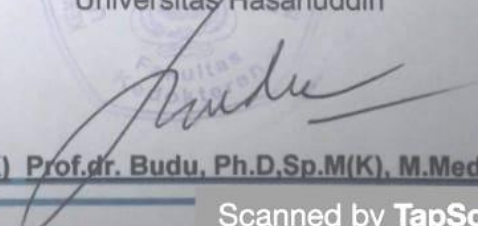

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
Promotor


Prof. Dr.dr.A. Wardhan Sinrang, MS, Sp.And
Ko-Promotor

Ketua Program Studi/S3
Ilmu Kedokteran,


Prof. dr.Muh. Nasrum Massi, Ph.D
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin


Prof.dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK (K) 
Prof.dr. Budu, Ph.D,Sp.M(K), M.Med.Ed

Scanned by TapScanner

DAFTAR TIM PENGUJI

1. Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok	Promotor/Penguji
2. Prof. Dr.dr.A. Wardihan Sinrang, MS, Sp.And	Ko.Promotor/Penguji
3. Prof. dr.Muhammad Nasrum Massi, Ph.D	Ko. Promotor/Penguji
4. Prof. Dr.drh. Dondin Suyuti, M.Sc	Penguji
5. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)	Penguji
6. Prof. Dr.dr.Peter Kabo, Ph.D, Sp.JP (K)	Penguji
7. Dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.S (K)	Penguji
8. Dr. Dr.Burhanuddin Bahar, MS	Penguji
9. Prof. Dr. dr. Johana Kandouw, Sp.PA(K)	Penguji

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Tetty Rina Aritonang S.

Nomor Mahasiswa : P 0200314413

Program studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Agustus 2018

Tetty Rina Aritonang S

PRAKATA

Puji syukur dan terimakasih yang tiada terukur saya sampaikan kepada Tuhan Yang Maha Esa dan Maha Kasih yang telah memberikan kehidupan, kesehatan, akal budi, hikmat, pengharapan dan semangat kepada saya sehingga dapat menyelesaikan disertasi ini tidak melebihi batas waktu yang sudah ditetapkan.

Penelitian ini terinspirasi dari pengalaman keseharian sebagai bidan dan dosen di kebidanan yang cukup sering mendengar keluhan dan kekuatiran pasien tentang efek samping setelah menggunakan alat/obat kontrasepsi moderen/sintetis, sementara Indonesia salah satu negara dengan jumlah penduduk tinggi dibanding negara berkembang lainnya. Penulis juga terinspirasi dengan hasil penelitian para ahli terdahulu mengenai manfaat dan efektifitas biji pinang sebagai anti fertilitas, serta pinang ini banyak dan mudah ditemukan di Asia umumnya dan di Indonesia khususnya. Oleh sebab itu penulis menetapkan penelitian tentang :**Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Pinang (Arecaçathecu L) terhadap Kadar FSH, LH, Estradiol, ekspresi mRNA Gen Reseptor Progesteron dan Siklus Estrus Mencit Balb/C Betina.**

Penulis sangat amat sadar bahwa penulis mustahil dapat menyelesaikan pendidikan dan disertasi ini tepat waktu tanpa peran serta dan bimbingan promotor, Co- promotor, para guru-guru saya , tim penguji, teman sejawat,

institusi terkait, keluarga, sahabat dan bapak/ ibu yang sudah membantu selama pendidikan dan selama penelitian. Oleh sebab itu secara khusus saya mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D. Sp.Biok sebagai promotor., Prof. Dr.dr. A. Wardihan Sinrang, MS, Sp.And. sebagai co-promotor., Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi Ph.D sebagai Co-promotor. Ucapan terimakasih yang tiada terukur dan ternilai saya sampaikan kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp. MK(K)., Dr. dr. Burhanuddin Mahar, MS., Prof. dr, Peter Kabo, Ph.D, Sp.JP(K)., dr. Cahyono Kaelan, Ph.Dr. dr. Johana Kandouw, Sp.PA (K) dan Prof. Dr. drh. Dondin Suyuti, M.Sc sebagai tim penguji disertai.

Penulis juga sampaikan ucapan terimakasih yang sebesar besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin Ibu Prof, Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA dan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Bapak Prof. dr. Budu, Sp M(K), M.Med Ketua Program Pasca Sarjana UNHAS serta ketua Pendidikan kedokteran Program Doktor (S3) Bapak Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) beserta jajarannya yang telah member kesempatan kepada kami dan saya khususnya untuk mengikuti pendidikan program doktor di bidang ilmu kedokteran sejak bulan Juli 2014 di FK. UNHAS.
2. Ketua Yayasan Medistra Indonesia, Bapak Usman Ompusunggu SE. dan Ibu Vermona Marbun S.Kep. MKM, beserta sivitas akademika STIKes Medistra Indonesia yang telah memberikan dukungan selama saya menjalankan pendidikan S3 FK. UNHAS.

drh. Dondin Suyuti, M.Sc beserta staff yang telah berbagi ilmu pengetahuan dan keterampilan menentukan hewan coba dan tehnik pemeriksaan/pengambilan sampel dari hewan coba untuk penelitian.

7. Staff Laboratorium Biologi Molekular dan Imunologi FK. UNHAS ,Bapak Romi Usman, Marwani, Wilhelmus Jebaru. Terimakasih yang sudah membantu kami kesehariannya di Laboratorium baik dalam pemeliharaan mencit, pengambilan sampel darah, penyimpanan sampel, sampai proses pemeriksaan sampel. Terimakasih banyak saudaraku, segala amal baik yang sudah kalian lakukan tidak akan sia – sia.
8. Kepada Dr. dr. Burhanuddin, MS dan Dr. dr. Ilham yang sudah mengajari ilmu SPSS, ilmu statistic dalam hal pengolahan dan analisa data. Terimakasih guruku, Bapak merupakan bagian dari keberhasilan saya untuk bias menyelesaikan disertasi S3 saya.
9. Terimakasih saya yang tulus juga saya sampaikan kepada Komite etik UNHAS yang telah memberi saran dan ijin penelitian saya, bapak Jibril (Pascasarjana UNHAS) yang telah membantu proses beasiswa saya, Bapak Dahyar, Bapak Akmal, Bapak Abdul MuiTanribali/Bapak Mumu, Ibu Nur (Staf Program studi S3 kedokteran) yang kesehariannya mendukung segala proses administrasi pendidikan S3 saya dan bapak Rayhan yang membantu penggandaan materi disertasi.
10. Mahasiswa S3 ilmu kedokteran angkatan 2014 afiliasi UKI – UNHAS yang sudah menjadi sahabat dan saudara yang menjadi teman belajar dan berdiskusi dalam kesehariannya. Terimakasih atas kerjasamanya,

dukungan moral yang member semangat untuk tetap bias bersama-sama menyelesaikan studi tepat waktu.

11. Orang tua saya Alister Aritonang Simaremare (alm)/Lumongga br Hutasoit, Mertua saya (Maruhum Butar-butur / Rotua br Hutagaol), dan keluarga besar Simaremare (J Simaremare/br Siahaan) dan Butar-butur yang senantiasa mendukung dan memotivasi kami untuk tetap maju dalam dunia pendidikan khususnya di bidang Kedokteran.
12. Suami terkasih Gerhard Hotma H. Butar-butur SE.MM dan kedua anak-anak saya Billiater Jordan Nathanael Butar-butur dan Bryan Jonathan Adriano Butar-butur yang menjadi penyemangat dan inspirator buat saya. Terimakasih atas kesabaran, dukungan, dan doanya sehingga mama dapat mengikuti dan menyelesaikan pendidikan S3 Kedokteran di Makassar meskipun kita tinggal di Bekasi.
13. Kepada Adekku Melva Nelly br Simaremare dan Anggiat Hiras Maharaja Simbolon, ponakanku (Steven dan Stevani), Mba Acem beserta semua pihak yang tidak saya sebutkan satu persatu, tanpa mengurangi rasa hormat saya. Terimakasih atas peran serta yang telah mendukung serta membantu saya selama pendidikan S3 kedokteran. Tiada pemberian yang lebih berharga yang saya sampaikan kecuali doa dan ucapan terimakasih yang sebesar besarnya. Tuhan berkati.

Makassar, Agustus 2018

Penulis

Tetty Rina Aritonang Simaremare.

Scanned by TapScanner

ABSTRAK

TETTY RINA ARITONANG. Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Pinang (*arecacatechu L.*) terhadap Kadar FSH, LH, Estradiol, Ekspresi mRNA Gen Reseptor Progesteron dan Siklus Estrus Mencit BALB/C Betina (Rosdiana Natzir, Andi Wardihan Sinrang).

Penelitian ini bertujuan menjelaskan efek ekstrak biji pinang terhadap kadar FSH, LH, estradiol, ekspresi mRNA gen reseptor progesterone dan siklus estrus mencit balb/c betina. Kontrol populasi sangat penting bagi kesejahteraan individu dan nasional. Meskipun berbagai agen kontraseptif sintetik tersedia, penggunaannya dikaitkan dengan efek samping yang parah. Pendekatan dilakukan untuk mengidentifikasi agen antifertilitas baru dari sumber-sumber alam.

Model hewan coba yang digunakan adalah lima belas ekor mencit balb/c betina dewasa, berumur 8-12 minggu, berat badan 20-40 gram dan diinduksi selama 1 minggu dengan ekstrak air biji pinang dengan dosis 1 gram/200 gram berat badan mencit (K1), 2 gram/200 gram berat badan mencit (K2) dan aquades pada kelompok kontrol (KO). Siklus estrus diidentifikasi dengan penilaian harian rasio relatif sel epitel berinti, cornified sel epitel skuamosa dan leukosit yang ditemukan pada saat apusan vagina selama 15 hari secara terus menerus. Tahap proestrus darah diambil dari ekor. Kadar FSH, LH, estradiol serum ditentukan dengan teknik ELISA, ekspresi mRNA gen reseptor progesterone dengan menggunakan *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar FSH, LH, estradiol serum dan ekspresi mRNA gen reseptor progesterone pada kelompok perlakuan (K1, K2) dibandingkan dengan kelompok kontrol (KO). Perubahan durasi siklus estrus terjadi pada kelompok perlakuan 1 (K1) menjadi memanjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) menjadi tidak estrus, sedangkan kelompok kontrol (KO) tidak mengalami perubahan durasi siklus estrus (normal). Penurunan kadar FSH, LH, estradiol serum dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron berpengaruh terhadap perubahan durasi siklus estrus mencit ($P=0,000$). Temuan ini memiliki implikasi penting untuk pengembangan kontrasepsi alami pada perempuan.

Kata Kunci: Ekstrak Biji Pinang, FSH, LH, Estradiol (E2), Progesteron, Siklus Estrus



ABSTRACT

TETTY RINA ARITONANG. *The Effect of Administration of Extract from Areca Nut Seeds (Areca Catechu L) on The FSH, LH, Estradiol, Expression of mRNA Progesteron Receptor General and Estrus Cycle BANB/C Female Rats* (supervised by: **Rosdiana Natsir and Wardihan Sinrang**)

This research is conducted: (1) to determine the effect of areca nut extract on the levels of FSH, LH, estradiol, mRNA expression of progesterone receptor gene and the estrus cycle of female balb/c mice, and (2) to identify new antifertility agents from natural source approach.

Population control was very important for individual and national welfare. Although various synthetic contraceptive agents are available, their use was associated with severe side effects. The experimental animal used were fifteen adult female balb/c mice, aging 8-12 weeks, weight 20-40 g, and induced for 1 (one) week with extract water of areca nut with a dose of 1g/200 g body weight of mice (K1), 2 g/200 g of body weight of mice (K2) and distilled water in the control group (KO). The estrus cycle was identified by a daily assessment of the relative ratio of nucleated epithelial cells, cornified squamous epithelial cells and leukocytes found at vaginal swabs for 15 days. In the proestrus stage blood is taken from the tail. Serum FSH, LH, estradiol levels were determined by ELISA techniques. Expression of progesterone receptor gene mRNA using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

The results show that there is a decrease in FSH, LH, serum estradiol levels and mRNA expression of the progesterone gene in the treatment group (K1, and K2) compared to the control group (KO). Changes in the duration of the estrus cycle occurred in treatment group 1 (K1) to be elongated and treatment group 2 (K2) became non-estrus, while the control group (KO) did not change the duration of the estrus cycle (normal). The decreasing of FSH levels, LH, serum estradiol, and mRNA expression of progesterone receptor gene affect the change in duration of estrous mice cycle ($P = 0,000$).

Keywords: areca nut axtract, FSH, LH, Estradiol (E2), progesterone, estrus cycle



Scanned by TapScanner

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	I
HALAMAN PENGAJUAN	II
LEMBAR PENGESAHAN	III
DAFTAR TIM PENGUJI	IV
PERYATAAN KEASLIAN DISERTASI	V
PRAKATA	VI
ABSTRAK	XI
ABSTRACT	XII
DAFTAR ISI	VI
DAFTAR TABEL	X
DAFTAR GAMBAR	XII
DAFTAR SINGKATAN	XIV
DAFTAR LAMBANG	XVI
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan penelitian	8
1.3.1 Tujuan Umum	8
1.3.2 Tujuan Khusus	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1. Manfaat teori	9
2. Manfaat aplikasi	9

BAB II . TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Deskripsi Tumbuhan Pinang (<i>Areca catechu</i> L.)	10
2.1.1 Tumbuhan Pinang	10
2.1.2 Morfologi Pinang	11
2.1.3 Kandungan Kimia Pinang	13
2.1.4 Penggunaan Ekstrak Pinang untuk Tindakan dan Obat-obatan:	16
2.1.5 Penelitian menggunakan biji pinang	24
2.1.6 Efek Apoptosis ekstrak biji pinang pada Sel	27
2.1.7 Efek hipoglikemik ekstrak biji pinang	30
2.1.8 Efek hipolipidemia ekstrak biji pinang	32
2.2 Pengendalian Hormon Reproduksi Betina	35
2.2.1 hipotalamus	35
2.2.2 Hipofisis	37
2.2.3 Ovarium	39
2.2.4 reseptor hormon	43
2.3 Endokrinologi reproduksi.	45
2.3 Siklus Reproduksi Mamalia Betina	50
2.5 Hormon Pengendali Siklus Estrus	59
2.6 Perbedaan Siklus Estrus dengan Siklus Menstruasi	65
2.7 Organ Reproduksi pada Mencit (<i>Mus musculus</i>)	66
2.8 Darah	67

2.9 Kerangka Pemikiran	69
2.10 Hipotesis	70
BAB III. METODE PENELITIAN	71
3.1 Jenis dan Disain penelitian	71
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	71
3.3 Subyek Penelitian	71
3.4 Kerangka Konsep	73
3.5 Variabel Penelitian	74
3.6 Definisi Operasional	75
3.7 Alat Dan Bahan Penelitian	76
3.8 Jenis data	77
3.9 Alur Penelitian	78
3.10 Prosedur Penelitian	79
3.11 Perlakuan pada hewan coba	80
3.12 Cara pengumpulan data	81
3.13 Penentuan siklus Estrus	83
3.1.4 Penentuan Ekspresi mRNA gen FSH dan LH	86
3.15 Analisis Statistik	87
BAB IV. HASIL PENELITIAN	88
A. Hasil Penelitian	88
1. Hasil analisis deskriptif Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K1 (sebelum perlakuan) dan K0, K1, K2 (setelah perlakuan)	89

2. Hasil analisis deskriptif status estrus sesuai Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K0, K1, K2 (setelah perlakuan)	90
3. Hubungan kelompok Kontrol dengan Kelompok 1 post	91
4. Hubungan kelompok kontrol dengan kelompok 2 post	92
5. Hubungan kelompok 1 post dengan kelompok 2 post	93
6. pengaruh perlakuan terhadap hormon	98
7. Hubungan siklus estrus kelompok kontrol (Normal) dengan kelompok perlakuan 1 (memanjang)	99
8 Hubungan siklus estrus kelompok kontrol (normal) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)	100
9 hubungan siklus estrus kelompok perlakuan 1 (memanjang) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)	101
10 Pengaruh hormon terhadap siklus estrus	106
BAB V. PEMBAHASAN	107
A. Efek Apoptosis ekstrak biji pinang pada Sel	111
B. EP (arecoline): Aktifitas hipoglikemik	115
C. EP (arecoline): Aktifitas Hypolipideatik	116
BAB VI. KESIMPULAN	121
KESIMPULAN	121
SARAN	121
SUMBER PUSTAKA	123
LAMPIRAN	136

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K1 (sebelum perlakuan) dan K0, K1, K2 (setelah perlakuan)	89
Tabel 2. Hasil analisis deskriptif status estrus sesuai Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K0, K1, K2 (setelah perlakuan)	90
Tabel 3 Hubungan kelompok Kontrol dengan Kelompok 1 post	91
Tabel 4. Hubungan kelompok kontrol dengan kelompok 2 post	92
Tabel 5 Hubungan kelompok 1 post dengan kelompok 2 post	93
Tabel 6 Pengaruh perlakuan terhadap hormon	98
Tabel 7 Hubungan siklus estrus kelompok kontrol (Normal) dengan kelompok perlakuan 1 (memanjang)	99
Tabel 8 Hubungan siklus estrus kelompok kontrol (normal) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)	100
Tabel 9: Hubungan siklus estrus kelompok perlakuan 1 (memanjang) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)	101
Tabel 10: Pengaruh hormon terhadap siklus estrus.....	106

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Pinang	11
Gambar 2 Struktur arecoline.	13
Gambar 3. Efek Arekolin 175 μ M (A)sel hidup berfluoresensi hijau (B) sel mati berfluoresensi oranye	29
Gambar 4 Sintesi kolesterol	32
Gambar 5. Jalur biosintesis progesteron pada sel luteal generik	33
Gambar 6 Hipotalamus	35
Gambar 7 Hipofisis	37
Gambar 8 Sintesis dan sekresi LH dan FSH yang diatur baik secara positif maupun negatif oleh steroid dan gonad peptide (Brown P and Mc.Neilly A.S. 1999).....	38
Gambar 9 Letak ovarium	40
Gambar 10 : Ovulasi	42
Gambar 11 : Peraturan hormonal di berbagai bagian dari siklus menstruasi	43
Gambar12 Skema representasi dari fungsi prediksi Fsh- dan / atau gen Lh-dependent. FSH dan LH merangsang gen reseptor gonadotropin.	44
Gambar 13 : Peranan hormon terhadap organ target	50
Gambar 14 A-C. Sitologi vagina mewakili setiap tahap estrus. Tiga jenis sel iidentifikasi: (A) epitel berinti (B) epitel cornified dan (C) leukosit. Rasio sel untuk menentukan tahap estrus mouse(<i>hasil yang representatif, gambar: D-G</i> statusnya langsung hormonal	58
Gambar 15 Model kerja saat ini untuk jalur utusan kedua yang terlibat dalam mengatur sel luteal kecil (kiri) dan besar (kanan).	62
Gambar 16 Status hormonal sesuai fase siklus estrus	65
Gambar 17 : Kerangka pemikiran	69

xviii

Scanned by TapScanner

Gambar 18 : Kerangka Konsep	73
Gambar 19 : Alur Penelitian	78
Gambar 20 : Cara pemberian ekstrak pinang peroral pada hewan coba ...	81
Gambar 21 : Cara pengambilan darah pada vena bagian ekor	82
Gambar 22 Alat identifikasi untuk membantu menentukan tahap estrus ketika menggunakan sitologi vagina berdasarkan jenis dan proporsi sel dismeat	85
Gambar 23 . Kadar estradiol serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang	94
Gambar 24 . Kadar FSH serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang	95
Gambar 25 . Kadar LH serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang	96
Gambar 26 . Ekspresi mRNA gen reseptor progesteron sesudah pemberian ekstrak biji pinang	97
Gambar 27 . Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar estradiol	102
Gambar 28 . Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar FSH	103
Gambar 29 . Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar LH	104
Gambar 30 . Perubahan Status estrus sesudah penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron.....	105

DAFTAR SINGKATAN

ACE: angiotensin-converting enzyme
AchE: acetyl-cholinesterase
AIF : *Apoptosis inducing factor*
APD: pankreas elastase ATP :
Adenosyn Triphosphate cAMP:
Siklik adenosin monofospat
CARD : *Caspase recruitment domain*
CE : kolesterol esterase
CREB : *Cyclic AMP Response Element Binding protein*
DNA: asam deoksiribonukleat
DPPH: diphenyl 2-picryl
E2 :Estradiol
EIA: *enzymeimmunoassay*
ESR: spin elektron resonansi
FSH :Follicle-stimulating hormone
FSH: *Follicle-stimulating hormone*
FSHR: FSH receptor
GABA : *Gamma- amino butyric acid*
GAD : *Glutamic Acid Decarboxylase*
GnRH : *Gonadotrophin Releasing Hormon*
GPCR: G protein-coupled receptor
GPCR: G protein-coupled receptor
H₂O₂: hidrogenperoksida
HDL: high density lipoprotein
HLE: elitase leukosit
HRE:*hormone response element*
hsp90: *heat shock protein-90* LDL
: low density lipoprotein
LH: Luteinizing hormone

LH: *Luteinizing hormone*

LHR: Reseptor hormon luteinizing

L-NAME: NG-nitro-1-arginine methylester

MDA :malondialdehida MPx:

myeloperoxidase mRNA:

messenger RNA

NO: oksida nitrat

P450scc : pregnancyenolone oleh cytochrome

pCEase: pankreas kolesterol esterase

PR: Progesteron

PRG: reseptor Progesteron

RIA: *radioimmunoassay*

RT-PCR : real time polimerase chain reaktion

StAR : steroidogenic akut regulatory protein

XO: xanthine oksidase

DAFTAR LAMBANG

°C : *derajat celcius*

cm: Centi meter

gr: gram kg:

kilogram m : meter

M : *molar* mg :

milligram mL :

milliliter

Nm: *nanometer*

OD : *optical density*

µg : *mikrogram* µL

: *mikroliter* µm :

mikrometer

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertumbuhan penduduk dunia setiap tahun mengalami peningkatan yang sangat pesat dan fantastis. Pada Tahun 2006 jumlah penduduk dunia telah mencapai 6,5 milyar jiwa. Diperkirakan pada akhir tahun 2050, jumlah penduduk dunia mencapai 9,5 miliar jiwa (UNDP, 2000), sedangkan jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2025 diperkirakan mencapai 273,65 juta (Fauzi A. et al., 2005). Ledakan jumlah penduduk menyebabkan terjadinya sejumlah dampak yang kurang menguntungkan, seperti kerusakan lingkungan, pemanasan global, wabah kelaparan, dan perkembangan penyakit (Page ST. et al., 2008).

Untuk mencegah terjadinya —baby boomingll di dunia khususnya di Indonesia diperlukan upaya yang sistematis, terarah, dan terukur, yaitu dengan menggalakkan penggunaan kontrasepsi melalui program Keluarga Berencana (KB). Pemerintah mencanangkan program keluarga berencana (KB) dengan menyediakan berbagai alat kontrasepsi yang bertujuan untuk menekan laju penduduk yang terus meningkat. Untuk mengatasi masalah bertambahnya jumlah penduduk telah banyak digunakan metode kontrasepsi modern. Kontrasepsi yang disediakan pemerintah berupa kontrasepsi hormon berupa tablet, suntikan dan pemasangan IUD. Alat kontrasepsi sangat berguna sekali dalam program KB, namun perlu diketahui bahwa tidak semua alat kontrasepsi

cocok dengan kondisi setiap orang, pengguna metoda kontrasepsi modern khawatir akan efek samping yang dapat mempengaruhi kehidupan sehari-hari mereka (Effie K Chipeta et al.,2010). Menurut Syahrums (1994) salah satu tujuan KB adalah penjarangan kehamilan dengan cara mengatur agar tidak terjadi nidasi atau perkembangan dari zigot. Kontrasepsi berupa pil, suntikan dan IUD yang disediakan cenderung mendatangkan efek samping, karena itu perlu dicari alternatif lain sebagai pengganti pil, suntikan dan IUD. Tumbuhan (bahan alami) dapat dijadikan/dimanfaatkan secara optimal sebagai penemuan obat baru, termasuk obat kontrasepsi (Pramono S. dan Katno. 2002).

Perkembangan ilmu pengetahuan terhadap pengolahan bahan-bahan alami mengalami peningkatan yang pesat. Hampir 80% dari penduduk dunia bergantung pada obat-obatan tradisional untuk perawatan kesehatan primer, yang sebagian besar melibatkan penggunaan ekstrak tumbuhan (Sandhya B et.al., 2006). Persiapan herbal juga telah digunakan sejak jaman dahulu kala untuk kesehatan reproduksi khususnya untuk menekan kesuburan, mengatur siklus menstruasi, menghilangkan dismenore, mengobati pembesaran prostat, gejala menopause, nyeri payudara dan rasa sakit selama dan setelah melahirkan (Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. 1996).

Di Indonesia perkembangan ilmu pengetahuan terhadap pengolahan bahan-bahan alami mengalami peningkatan yang pesat. Saat ini, banyak peneliti yang melakukan eksplorasi terhadap bahan-bahan alami terutama tanaman untuk mengetahui berbagai

macam kandungan zat di dalamnya (misalnya berbagai jenis alkaloid) dan manfaatnya bagi peningkatan kualitas peradaban/kehidupan manusia (Syadida *et al.* 2005). Salah satu bahan yang banyak diteliti adalah pinang (*Areca catechu*). Biji pinang mengandung *arecoline*, yaitu senyawa alkaloid aktif. *Arecoline* merupakan komponen utama yang terdapat di dalam biji pinang (Shyi-Wu *et al.*, 2008).

Terdapat empat alkaloid utama di dalam biji pinang, yaitu *arecoline* (7,5 mg/g), *arecaidine* (1,5 mg/g), *guvacoline* (2,0 mg/g), dan *guvacine* (2,9 mg/g) (Wang CK. *et al.*1997). Penelitian tentang efek pemberian *arecoline* terhadap reproduksi manusia masih sangat jarang dilakukan (Yang *et al.*2001),

Tumbuhan pinang (*Areca catechu* L.) adalah salah satu jenis tumbuhan palma yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan ramuan obat. Bukti menunjukkan bahwa biji pinang telah lama digunakan secara luas sebagai obat tradisional. Diperkirakan sekitar 500 juta orang di dunia saat ini menggunakan biji pinang secara berkala dalam bentuk berbagai sediaan. Selain itu, diketahui bahwa sekitar 200-600 juta orang di dunia mengkonsumsi pinang selama hidup mereka (Giri *et al.*, 2006). Selain itu, sekitar 10% masyarakat di dunia mengkonsumsi pinang secara kontinu (Sahelian, 2004).

Biji pinang (*Areca catechu*) merupakan salah satu bahan alam yang berkhasiat sebagai kandidat antifertilitas pria. Penelitian telah mengungkapkan bahwa pinang menyebabkan perubahan morfungsional seperti stimulasi hormonogenesis dan gangguan spermatogenesis, (Azeez S, Amudhan MS.2006) menurunkan motilitas spermatozoa dan

konsentrasi spermatozoa (Akmal M, et al.,2008) Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Kiong Er *et al.*, (2006) yang menunjukkan bahwa terjadinya penurunan motilitas spermatozoa manusia akibat paparan *arecoline* secara *in vitro*.

Beberapa hasil penelitian lain menunjukkan bahwa pemberian *arecoline* dapat menyebabkan terjadinya sitotoksitas pada berbagai sel mamalia (Jeng *et al.*, 2001) dan terjadinya nekrosis sel spermatogonia, spermatosit, spermatid, sel Sertoli, dan sel Leydig ayam jantan akibat paparan serbuk biji pinang

(Susila. 2003). Selain itu, hasil penelitian Aulanni'am *et al.* (2007) menunjukkan bahwa terjadinya apoptosis sejumlah besar sel spermatogenik dan sel Sertoli tikus putih akibat paparan ekstrak biji pinang. Fraksi air ekstrak biji pinang menyebabkan terjadinya apoptosis terhadap sel-sel jaringan testis (spermatogonia, spermatosit primer, spermatid, sertoli dan Leydig) tikus (*Rattus norvegicus*). Belum diketahui secara pasti, bagaimana mekanisme kejadian apoptosis sel sel jaringan testis akibat pemberian ekstrak biji pinang. Namun dapat dijelaskan bahwa paparan alkaloida-alkaloida yang terkandung dalam ekstrak biji pinang kemungkinan menyebabkan kerusakan DNA sel-sel jaringan testis. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Sinha dan Rao (1985) bahwa *arecoline* sebagai alkaloida utama biji pinang dapat menyebabkan kerusakan DNA sel-sel germinal. Kerusakan DNA suatu sel menyebabkan sel menjadi stress dan ini memicu sel untuk melakukan proses apoptosis.

Ekstrak biji pinang mengandung bahan yang bersifat afrosidiak (meningkatkan gairah seks) yang dibuktikan dengan meningkatnya konsentrasi testosteron di dalam darah (Akmal M, et al, 2010). Akan tetapi, konsentrasi testosteron yang terus meningkat di dalam darah dapat memberikan efek yang kurang menguntungkan terhadap spermatogenesis. Hal ini disebabkan konsentrasi testosteron yang terus meningkat dalam darah akan melakukan umpan balik (*feedback*) negatif terhadap kelenjar hipofisis, sehingga akan berdampak terhadap terhambatnya sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan LH, dan akan menghambat/ mengganggu spermatogenesis. Akan tetapi, pathway yang mana dari FSH dan LH yang terganggu akibat pemberian ekstrak air biji pinang belum dapat dipastikan. Hal ini tentunya membuka peluang yang lebih luas untuk mempelajari efek biji pinang pada level molekuler proses pematangan folikel ovarium, ovulasi dan siklus estrus dalam upaya membuka tabir potensi biji pinang sebagai kandidat antifertilitas pada wanita.

Pemantauan siklus estrus pada betina berperan penting pada keberhasilan fertilisasi dan reproduksi untuk meningkatkan jumlah populasi hewan (Nalley *et al.*, 2011), Siklus estrus merupakan salah satu aspek reproduksi yang menggambarkan perubahan kandungan hormon reproduksi yang disebabkan oleh aktivitas ovarium yang dipengaruhi hormon gonadotropin. Perubahan kandungan hormon reproduksi selanjutnya menyebabkan perubahan struktur pada jaringan penyusun saluran reproduksi (Toelihere, 1979). Siklus estrus adalah periode atau masa dari permulaan periode birahi ke periode birahi berikutnya. Siklus

estrus merupakan cerminan berbagai aktivitas yang saling berkaitan antara hipotalamus, hipofisis dan ovarium (Akbar, 2010). Siklus estrus terdiri dari empat fase yaitu fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Siklus estrus merupakan salah satu aspek reproduksi yang menggambarkan perubahan kandungan hormon reproduksi yang disebabkan oleh aktivitas ovarium yang dipengaruhi hormon gonadotropin. Perubahan kandungan hormon reproduksi selanjutnya menyebabkan perubahan struktur pada jaringan penyusun saluran reproduksi (Toelihere, 1979). Pertumbuhan telur, folikel ovarium dan ovulasi dikendalikan oleh hormon FSH dan LH serta hormon steroid estrogen dan progesterone (Lufri dan Helendra 2009). Oleh sebab itu dapat dinyatakan pertumbuhan folikel ovarium dikendalikan oleh hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa dan FSH yang dihasilkan oleh pituitari (hipofisa). Hormon ini berperan penting dalam siklus reproduksi. Melalui mekanisme *Feed back*, mekanisme umpan balik positif estradiol dan progesteron di bawah kondisi tertentu dapat meningkatkan pembebasan LH dan FSH selama siklus menstruasi, peningkatan konsentrasi estradiol pada bagian akhir dari fase folikel pra ovulasi dari LH adalah melalui mekanisme ini. Penundaan siklus estrus terjadi karena kurangnya hormon *Lutheizing Hormone* (LH) dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang dihasilkan hipofisis. Harborn (1987) dalam Sumarmin (2001) mengatakan mekanisme yang jelas belum pasti tetapi hal yang mungkin terjadi adalah dengan kurangnya LH dan FSH maka dominasi estrogen akan semakin tinggi akibat adanya triterpenoid,

terpenoid dan alkaloid sehingga keadaan ini lebih lanjut akan menyebabkan fase diestrus dan proestrus diperpanjang.

1.2 Perumusan Masalah penelitian

Penundaan siklus estrus terjadi karena kurangnya hormon *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) yang dihasilkan hipofisis. Harborn (1987) dalam Sumarmin (2001) mengatakan mekanisme yang jelas belum pasti tetapi hal yang mungkin terjadi adalah dengan kurangnya LH dan FSH maka dominasi estrogen akan semakin tinggi akibat adanya triterpenoid, terpenoid dan alkaloid sehingga keadaan ini lebih lanjut akan menyebabkan fase diestrus dan proestrus diperpanjang.

1. Apakah pemberian ekstrak biji pinang dapat mengganggu siklus estrus pada balb/c melalui pengaruhnya pada kadar FSH, LH, Estradiol dan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron?
2. Apakah ada perbedaan lama siklus estrus berdasarkan perbedaan dosis ekstrak pinang, dosis berapa yang paling efektif mempengaruhi siklus estrus?
3. Apakah ada perbedaan dinamika kadar FSH, LH, Estradiol dan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron berdasarkan perbedaan dosis?
4. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron antara yang diberikan ekstrak biji pinang dengan yang tidak diberikan ekstrak biji pinang?

5. Bagaimana efek ekstrak biji pinang yang di berikan terhadap kadar FSH, LH, Estradiol, ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron dan siklus estrus.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh pemberian ekstrak biji pinang terhadap ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron, kadar FSH, LH, Estradiol dan lama siklus estrus mencit balb/c betina.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini untuk mengetahui:

- a. Efek pemberian ekstrak biji pinang dapat mengganggu lama siklus estrus pada balb/c melalui pengaruhnya pada ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron
- b. Perbedaan lama siklus estrus antara kelompok yang diberikan ekstrak pinang dengan yang tidak diberikan
- c. Perbedaan lama siklus estrus berdasarkan perbedaan dosis ekstrak pinang
- d. Perbedaan dinamika kadar FSH, LH, Estradiol dan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron berdasarkan perbedaan dosis

- e. Perbedaan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron antara yang diberikan ekstrak pinang dengan yang tidak diberikan ekstrak pinang

1.4 Manfaat Penelitian

a. Manfaat teori

Memberi informasi tentang potensi ekstrak biji pinang sebagai kandidat antifertilitas melalui pengaruhnya terhadap ekspresi mRNA gen reseptor progesteron, kadar FSH, LH, Estradiol dan lama siklus estrus mencit balb/c betina

b. Manfaat aplikasi

Sebagai data yang bisa dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya mengenai peran biji pinang sebagai alternatif antifertilitas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tumbuhan Pinang (*Areca catechu L.*)

2.1.1 Tumbuhan Pinang

Pinang merupakan sejenis tumbuhan yang banyak ditemukan di kawasan Pasifik, Afrika dan juga benua Asia. Tumbuhan ini memiliki buah dengan cangkang serabut serupa kelapa. Buah tumbuhan ini juga dinamai sama dengan tanamannya, Pinang.

Dunia mengenal buah yang satu ini dengan nama *Betel Palm* atau *Betel Nut Tree*. Di Indonesia, Pinang memiliki nama daerah seperti pineng, pineung (Aceh), pinang (Gayo), batang mayang (Karo), pining (Toba), batang pinang (Minangkabau), dan jambe (Sunda, Jawa) (Depkes RI, 1989). Sementara itu dalam kajian ilmiah, pinang dikenal dengan nama *Areca Catechu*. Tanaman pinang diklasifikasikan ke dalam kerajaan Plantae, divisi Spermatophyta (menghasilkan biji), sub divisi Angiospermae (berbiji terbuka), kelas Monocotyledonae (berkeping satu), ordo Arecales, famili Arecaceae (palem-paleman), genus *Areca*, dan spesies *Areca catechu L.* (Amudhan dkk., 2012).

Bagi Indonesia, pinang dianggap sebagai bagian dari budaya leluhur sebab pinang merupakan salah satu buah yang sering dijadikan pelengkap upacara adat. Selain itu, pinang juga populer dijadikan pelengkap budaya menyirih di berbagai daerah di

Indonesia. Sementara itu, di luar negeri, pinang lebih populer diolah menjadi panganan nikmat seperti permen dan cemilan lainnya. Di balik rasa pinang yang khas, ia menyimpan manfaat yang cukup mengejutkan khususnya buah yang masih muda.



Gambar 1: Pinang

<http://sudut-bacaan.blogspot.co.id/2013/03/mengurai-1001khasiat-buah-pinang-muda.html>

2.1.2 Morfologi Pinang

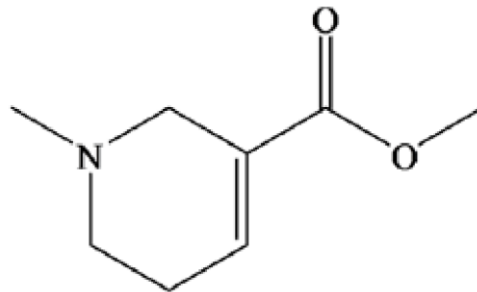
Pinang biasa ditanam di pekarangan, taman, atau dibudidayakan. Tanaman ini kadang tumbuh liar di tepi sungai dan tempat lain dan dapat ditemukan dari 1-1400 m di atas permukaan laut. Pohon berbatang langsing, tumbuh tegak, tinggi 10-30 m, diameter 15-20 cm, tidak bercabang, dengan bekas daun yang lepas. Daun majemuk menyirip, tumbuh berkumpul di ujung batang membentuk roset batang, dan panjang helaian daun 1-1,8 m. Pelepa daun berbentuk tabung, panjang sekitar 80 cm, dan tangkai daun pendek.

Helai anak daun mempunyai panjang 85 cm, lebar 5 cm, dengan ujung sobek dan bergigi.

Tongkol bunga dengan seludang panjang yang mudah rontok, keluar dari bawah roset daun, panjang sekitar 75 cm, dengan tangkai pendek bercabang rangkap. Ada satu bunga betina pada pangkal, di atasnya banyak bunga jantan tersusun dalam dua baris yang tertancap dalam alur. Bunga jantan panjang 4 mm, berwarna putih kuning, dan benang sari 6. Bunga betina panjang sekitar 1,5 cm, hijau, bakal buah beruang satu. Buah bentuk buni, bulat telur sunsang memanjang, panjang 3,5-7 cm, dinding buah bersabut, warna merah jingga jika masak. Biji satu, bentuk seperti kerucut pendek dengan ujung membulat, pangkal agak datar dengan suatu lekukan datar, panjang 1530 mm, permukaan luar berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk menyerupai jala dengan warna yang lebih muda (Dalimartha, 2009). *Areca catechu* L. (pinang) merupakan tanaman famili *Arecaceae* yang buahnya berkecambah setelah 1,5 bulan da 4 bulan kemudian mempunyai jambul daun-daun kecil yang belum terbuka. Pembentukan batang baru terjadi setelah 2 tahun dan berbuah pada umur 5-8 tahun tergantung keadaan tanah. Tanaman ini berbunga pada awal dan akhir musim hujan dan memiliki masa hidup 25-30 tahun. Biji buah berwarna kecoklatan sampai coklat kemerahan, agak berlekuk-lekuk dengan warna yang lebih muda. Pada bidang irisan biji tampak perisperm berwarna coklat tua dengan lipatan tidak beraturan menembus endosperm yang berwarna agak keputihan (Depkes RI, 1989).

2.1.3 Kandungan Kimia Pinang

Komponen utama biji pinang adalah karbohidrat, lemak, serat, polifenol yang meliputi flavonoid dan tanin, alkaloid dan mineral. Kandungan alkaloid dalam biji sebesar 0,3-0,7% yang bekerja kolinergik, seperti arecolin (C₈H₁₃NO₂), terdapat empat alkaloid utama di dalam biji pinang, yaitu *arecoline* (7,5 mg/g), *arecaidine* (1,5 mg/g), *guvacoline* (2,0 mg/g), dan *guvacine* (2,9 mg/g). (Wang CK., *et al.*, 1997),



Gambar 2 Struktur arecoline. (Chutima Jantararat *et al.* 2012)

Selain itu, mengandung tanin terkondensasi 15%, areca red lemak 14% (palmitic, oleic, linoleic, palmitoleic, stearic, caproic, caprylic, lauric, dan miristic acid, saponin (diosgenin), steroid (kriptogenin, β sitosterol), asam amino, choline, catechin. Biji segar mengandung sekitar 50% lebih banyak alkaloid dibandingkan biji yang telah diproses (Dalimartha, 2009). Bubuk biji kering kacang pinang mentah mengandung lebih banyak arecoline dari pada serbuk biji kering dari biji buah pinang matang ($p < 0,05$). (Chutima Jantararat, *et.al.* 2012) Ekstrak etanolik biji buah pinang mengandung tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, flavan, dan senyawa fenolik, asam galat, getah, lignin,

minyak menguap dan tidak menguap, serta garam (Wang CK., Lee WH & Peng CH 1997). Kegunaan buah pinang banyak sekali terutama sebagai obat tradisional,

- a. Pinang terutama ditanam untuk dimanfaatkan bijinya, yang di dunia Barat dikenal sebagai betel nut. Biji ini dikenal sebagai salah satu campuran orang makan sirih, selain gambir dan kapur.
- b. Biji pinang mengandung alkaloida seperti misalnya arekaina (arecaine) dan arekolina (arecoline), yang sedikit banyak bersifat racun dan adiktif, dapat merangsang otak. Sediaan simplisia biji pinang di apotek biasa digunakan untuk mengobati cacingan, terutama untuk mengatasi cacing pita. Sementara itu, beberapa macam pinang bijinya menimbulkan rasa pening apabila dikunyah. Zat lain yang dikandung buah ini antara lain arecaidine, arecolidine, guracine (guacine), guvacoline dan beberapa unsur lainnya.
- c. Secara tradisional, biji pinang digunakan dalam ramuan untuk mengobati sakit disentri, diare berdarah, dan kudisan. Biji ini juga dimanfaatkan sebagai penghasil zat pewarna merah dan bahan penyamak.
- d. Akar pinang jenis pinang hitam, di masa lalu digunakan sebagai bahan peracun untuk menyingkirkan musuh atau orang yang tidak disukai. Pelepah daun yang seperti tabung (dikenal sebagai upih) digunakan sebagai pembungkus kue-kue dan makanan. Umbutnya dimakan sebagai lalapan atau dibikin acar.
- e. Batangnya kerap diperjual belikan, terutama di kota-kota besar di

Jawa menjelang perayaan Proklamasi Kemerdekaan 17 Agustus, sebagai sarana untuk lomba panjat pinang. Meski kurang begitu awet, kayu pinang yang tua juga dimanfaatkan untuk bahan perkakas atau pagar. Batang pinang tua yang dibelah dan dibuang tengahnya digunakan untuk membuat talang atau saluran air.

- f. Pinang juga kerap ditanam, di luar maupun di dalam ruangan, sebagai pohon hias atau ornamental.
- g. Kulit buah pinang mengandung tanin terkondensasi. Arecolin bekerja sebagai obat cacing dengan melumpuhkan taenia, terutama *Taenia solium*. Arecolin juga berkhasiat penenang, antivirus, dan antijamur. Kerja kolinergiknya akan meningkatkan sekresi dan peristaltik usus, melambatkan denyut jantung, dan menurunkan tekanan darah (Dalimartha, 2009). Biasanya obat tradisional digunakan dengan cara menyeduh, baik segar ataupun yang telah dikeringkan, dengan air panas kemudian air seduhan tersebut diminum, kadang-kadang hanya dengan menggunakan air perasan dari tumbuhan segar (Rusdi, 1988). Biji dan kulit biji bagian dalam dapat juga digunakan untuk menguatkan gigi goyah. Selain sebagai obat penguat gigi, biji pinang muda digunakan sebagai obat untuk mengecilkan rahim, setelah melahirkan oleh kaum wanita dengan cara memasak buah pinang muda tersebut dan airnya diminum, melancarkan sirkulasi dan meningkatkan tenaga (Anonim, 2005). Ekstrak etanol biji pinang muda (*Areca catechu* L.) menunjukkan adanya aktifitas stimulasi susunan saraf pusat. (Meiyanto E. et al.. 2008)

h. Umbutnya dimakan sebagai lalap atau acar, sedangkan buahnya merupakan salah satu ramuan untuk makan sirih. Inang merupakan tanaman penghasil zat samak. Pelepah daun digunakan untuk membungkus makanan dan bahan campuran untuk pembuatan topi. Perbanyak dengan biji (Dalimartha, 2009).

2.1.4 Penggunaan Ekstrak Pinang untuk Tindakan dan Obatobatan:

1. **Antioksidan:** Ekstrak etanol dari arecanut menunjukkan ampuh anti oksidatif, radikal bebas, dan aktivitas anti-hyaluronidase. Anti- Efek oksidatif ekstrak lebih rendah dari butylated hydroxytoluene, namun mirip dengan tokoferol dan lebih tinggi dari asam askorbat (BJ Kim, JH Kim, HP Kim and MY Heo 1997). Ekstrak arecanut menunjukkan 1, 1 diphenyl 2-picryl (DPPH) aktivitas radikal bebas (M Ohsugi, et.al.1999)

Ekstrak arecanut mengandung efek penghambatan *in vitro* pada H₂O₂ menyebabkan hemolisis RBC (M Senthil Amudhan and V Hazeena Begum, 2005)
2. **Antiinflamasi / Anti Melanogenesis:** Arecanut ekstrak aplikasi topikal menghambat hyaluronidase aktivitas *in vivo* pada hipersensitifitas dan edema telinga yang diinduksi croton pada tikus saat itu. Hasil ini sangat menyarankan arecanut ekstrak dapat mengurangi kekebalan tubuh/regulasi/inflamasi pada masalah kulit. Pemutih kulit Efek ekstrak arecanut ditunjukkan melalui aktivitas penghambatan aktivitas tirosinase jamur dan sintesis melanin pada sel melanoma B16. Studi ini menunjukkan bahwa ekstrak arecanut efektif anti-agen peradangan/anti melanogenesis dan bisa digunakan sebagai agen kosmetik baru

(Kuk Kook,. Et.al.1999).

3. **Penuaan kulit dan Kosmetik:**

Efek anti penuaan dari *Areca catechu* L., di kulit diselidiki baik *in vitro* maupun *in-vivo* . Ekstrak arecanut memiliki proporsi tinggi prolin (13%) amino bebas kandungan asam. Efek penghambatan dari arecanut Ekstrak pada elastase dipamerkan inhibisi 37-90% pada porselen pankreas elastase (APD) dan manusia elastase leukosit (HLE). Serat elastin meningkat dengan arecanut ekstrak. Ekstrak arecanut menunjukkan perlindungan serat elastis terhadap degradasi oleh elastase enzim *in vitro* assay. Ekstrak arecanut peningkatan proliferasi sel fibroblas manusia dibandingkan dengan kontrol dan asam askorbat standar. Perlakuan dengan ekstrak arecanut menunjukkan adanya peningkatan sintesis kolagen, perbaikan pada kulit hidrasi, elastisitas kulit, dan keriput kulit dan menyarankan bahwa ekstrak arecanut dapat digunakan sebagai komponen anti penuaan baru untuk kosmetik (KK Lee, JD Choi. 1999) . Ekstrak Arecanut dilaporkan memiliki penghambatan aktivitas pada enzim elastase dan hyaluronidase hadir dalam jaringan kulit dan ekstrak arecanut dimurnikan dengan fraksi pelarut dan diidentifikasi zat fenolik yang menunjukkan kompetitif penghambatan dengan substrat. Hasil ini menunjukkan zat fenolik yang dimurnikan dari *A. catechu* memiliki efek anti penuaan dengan cara melindungi penghubung jaringan (Kuk.-Kook JJ Lee. et.al.2001) .

4. **Aktivitas hipoglikemik:**

Arecoline diselidiki dan dilaporkan memiliki aktivitas hipoglikemik dimodel hewan diabetes pada subkutan administrasi. Administrasi subkutan dari fraksi alkaloid dari *Areca catechu* menjadi alloxanized.

Kelinci menunjukkan efek hipoglikemik yang signifikan berlangsung selama 4/6 jam (B Chempakam, 1993) .

5. **Hypolipideatik:**

Ekstrak buah pinang ditemukan menunjukkan Aktivitas penghambatan kolesterol yang kuat pada tikus dengan kadar kolesterol tinggi. Dalam studi lain, tikus diberi makan makanan yang mengandung minyak jagung dengan pinang ekstrak suplemen Suplementasi dari ekstrak arecanut secara signifikan menurunkan penyerapan trigliserida dan konsentrasi lipid plasma (Byun SJ. et.al.2001) Ekstrak arecanut ditemukan *secara in vitro* Aktivitas penghambatan yang kuat melawan pankreas kolesterol esterase (pCEase) dan ternyata lebih rendah penyerapan ester kolesterol diet (SM Jeon. 2000). Selanjutnya, baik penyerapan usus bebas kolesterol dan aktivitas pCEase usus kecil diturunkan secara signifikan saat diberi makanan mengandung kolesterol bebas dengan suplemen ekstrak pinang (YB Park. et. al. 2002)

6. **Penghambatan α -Glucosidase dan Hipoglikemik**

Aktivitas: aktivitas inhibisi *in-vitro* alfa-Glikosidase dan efek hipoglikemik dengan pemberian ekstrak etanol arecanut per oral pada tikus telah diselidiki. Ekstrak arecanut *in-vitro*, aktivitas penghambatan α -glucosidase usus enzim maltase dan nilai IC 50 Aktivitas maltase dan sucrase masing-masing ditemukan 12 μ g / ml dan 30 μ g / ml ekstrak

arecanut. Elevasi postprandial pada kadar glukosa darah pada 30 dan 60 menit setelah pemberian maltosa, namun saat pemberian maltosa dengan etanol ekstrak arecanut (250 mg / kg dan 500 mg / kg dosis) menunjukkan penekanan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol untuk mengendalikan kadar glukosa darah pada 30 dan 60 menit. Hasil ini menunjukkan bahwa Ekstrak arecanut memiliki α -glukosidase yang manjur inhibitor dan akan efektif dalam Penekanan elevasi glukosa darah setelah pemberian maltosa per oral pada tikus (M Senthil Amudhan, V. Hazeena Begum, 2008)

7. **Antihipertensi:**

Fraksi arecanut dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan *in vitro* yang manjur pada angiotensin-converting enzyme (ACE). Pemberian fraksi arecanut spontan pada tikus hipertensi (SHR). Efek antihipertensi dengan dosis 100 dan 200 mg / kg sebanding dengan captopril pada dosis 30 dan 100 mg / kg. Pemberian Fraksi arecanut per intravena ke SHR dihasilkan dengan cepat dan ditandai penurunan tekanan darah pada dosis 10 dan 15 mg / kg. Efek Antihipertensi maksimal fraksi arecanut pada dosis IV 15 mg / kg, 5 kali lebih besar dari kaptopril pada dosis yang sama (J Inokuchi, 1986) .

8. **Vascular-relaxation:**

Ekstrak *Areca catechu* memiliki efek vasodilatator pada aorta tikus yang diisolasi endotelium dan relaksasi belum terjadi pada spesimen tanpa endothelium (Hirozo Goto, 1997). Arecoline merilekskan arteri umbilical manusia dan cincin vena, semakin tinggi konsentrasi dari arecoline, semakin besar relaksasi cincin dan relaksasi itu menurun setelah

endotelium diangkat atau diolah dengan L-NAME, penghambat nitrat oksida sintase. Arecoline meningkat tergantung dosis cGMP tingkat arteri umbilikalis manusia dan vena. Efek relaks dari arecoline di umbilical arteri dan cincin pembuluh darah tergantung endothelium-melalui sistem NO-cGMP (FC Kuo, et.al. 2005) .

9. **Antidepresan:**

Aktivitas antidepresan adalah dievaluasi pada tikus yang dipaksa renang dan tes suspensi ekor. Ekstrak etanol (4-80 mg / kg) menyebabkan penurunan yang signifikan pada Waktu imobilitas tanpa efek spontan aktivitas motor. Temuan ini menunjukkan bahwa Ekstrak etanol memiliki aktivitas antidepresan (FC Kuo, et.al. 2005) . Fraksi arekanut diklorometana dari pinang memiliki efek penekan ketergantungan pada tikus dengan penarikan morfin yang masuk (E Kumarnsit, et.al. 2005).

10. **Antimikroba:**

Asam lemak arecanut (miristic dan asam oleat) dan procyanidins dari kacang pinang (*Areca catechu* L.) diturunkan menjadi prinsip antibakteri utama melawan bakteri kariogenik primer, *Streptococcus mutans* , dan penghambat utama aktivitas melawan glucosyltransferase dari *S. mutans* (Sumitra Hada, et.al.2006). Ekstrak arecanut menghambat pertumbuhan organisme saliva, yang dibudidayakan dari air liur setelah mengunyah pinang rebus, seperti *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, dan *Fusobacterium nucleatum* dan *Staphylococcus aureus* , secara konsentrasi tergantung, kacang panggang dan rebus dilaporkan menunjukkan lebih manjur dibanding kacang mentah. Telah di laporkan

bahwa tanin terhidrolisis dalam fraksi tannin, yang meliputi asam tannic, bisa menjadi penyebabnya sifat antibakteri dari mur dan Paparan intra oral yang berkepanjangan pada kacang bisa menekan bakteri di mulut (CM De Miranda, et. al.1996) *Areca catechu* dilaporkan menunjukkan efek penghambatan pada pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus salivarius* dan 5'- Aktivitas penghambatan nukleotidase, yang mungkin berguna sebagai agen pencegahan anti-plak pada gigi (M Iwamoto, et. al. 1991) .

11. Profil penyembuhan luka ekstrak *Areca catechu* :

Alkaloid arecoline, polifenol arecanut dan formulasi gabungan meningkatkan pemecahannya kekuatan pada model luka sayatan. Semua Ekstrak meningkatkan kontraksi luka pada Hari ke 4 dan ke 16 dan periode epitelisasi. Fraksi Alkaloid meningkatkan kekuatan tarik jaringan granulasi. Studi ini menunjukkan bahwa alkaloid dari arecanut dan polifenol dari pinang bisa digunakan untuk meningkatkan penyembuhan luka bakar luka, ulkus kaki dan operasi cangkok kulit (Shamina Azeez, et.al.2007).

12. Efek perlindungan ekstrak etanol *Areca catechu* pada lesi di mukosa lambung:

a. Aktivitas antiulkulosa ekstrak etanol dari *Areca catechu*. Pengobatan etanol secara signifikan meningkatkan tingkat mukosa lambung malondialdehida (MDA, sebuah indeks peroksidasi lipid), oksida nitrat (NO) dan peningkatan aktivitas myeloperoksidase (MPx, indeks infiltrasi neutrofil) dan xanthine oksidase (XO) enzim. Induksi etanol juga menunjukkan signifikan pengurangan glutathione mukosa

lambung (GSH), asam sialat dan tingkat asam deoksiribonukleat (DNA). Efek pelindung 250mg/kg dan 500mg/kg dosis *A. catechu* pada etanol disebabkan cedera mukosa lambung mungkin karena efek antioksidannya (M Senthil Amudhan, dan V Hazeena Begum 2008)

13. Kapasitas antiradik:

Ekstrak metanol dari *A.catechu* menunjukkan aktivitas antiradik yang kuat. Selain itu, ekstrak methanolik *A. catechu* mengandung sejumlah fenol dan flavonoid, yang memainkan peran utama dalam mengendalikan oksidasi. Ekstrak *A. catechu* dapat digunakan sebagai antioksidan, dan kemungkinan dikembangkan sebagai bahan antioksi dan naturel (Chia-Ching Li dan En-Shyh Lin, 2010)

14. Anti alergi: *Arecae* (*Areca catechu*)

Dilaporkan memiliki inhibitor antigen yang paling manjur-induksi degranulasi pada sel mast. *Areca catechu* menghambat DNP-BSA-dan degranulasi senyawa 48/80-induksi pada sel mast dan menunjukkan aktivitas penghambatan pada senyawa anafilaksis tipe 48/80 yang diinduksi 46% pada tikus. Menghambat ekspresi TNF- α dan aktivasi mitogen protein kinase teraktivasi, ERK1 / 2, yang sangat penting untuk produksi sitokin inflamasi di sel mast, seperti mengaktifkan fosforilasi ERK1/2. Hasil ini menunjukkan bahwa *Areca catechu* berguna untuk perawatan berbagai penyakit alergi akut dan kronis. (JH Lee, et.al.2004)

15. **Aktivitas antikonvulsan:** Arecaidine dan guvacine,

Areca catechu menghambat serapan GABA dan α -alanin. Dosis besar dari arecaidine (1g/kg subkutan) sedikit mengurangi efek mematkan dari bicuculline pada tikus tapi tampaknya memiliki sedikit atau tidak ada aktivitas antikonvulsan (D Lodge, et.al.1977)

16. **Aktivitas penghambatan agregasi trombosit:**

Ekstrak Arecanut menghambat agregasi trombosit yang disebabkan oleh asam arakidonat, adenosin fosfat. Faktor pengaktifan platelet dan epinefrin dan Ca + ionofor. Ekstrak arecanut menunjukkan penghambatan aktivitas ADP dan Ca + ionophore. Ekstrak Arecanut menunjukkan signifikan penghambatan esterase asetilkolin (MN Ghayur, et.al.2011)

17. **Pencegahan Rongga Gigi:**

Sirih digunakan dalam pasta gigi untuk mencegah gigi berlubang. Laboratorium penelitian menunjukkan bahwa pinang mungkin memiliki efek antibakteri, yang dapat mengurangi pengembangan rongga. Pinang dibuat menjadi pasta gigi karena sifat astringentnya. (JC Kurian, 1995)

18. **Stimulan sistem syaraf pusat:**

Sirih mungkin menyebabkan efek stimulan dan euforia. Akibatnya, itu kadang digunakan untuk relaksasi. Reaksi inflamasi dihentikan saat transdermal secara sistemik mengantarkan arecoline, kolinergik, untuk pengelolaan gangguan neurologis pada manusia (RN Chopra, 19995).

19. Aktivitas anti-HIV:

Berbagai unsur aktif seperti procyanidins, areca tannin B1 dan ekstrak dari Bibit arecanut menunjukkan penghambatan aktivitas protease HIV

(M Marastoni, et.al.2004)

20. Penghambat proteasom:

Proteasom menghidrolisis berbagai regulator siklus sel, faktor transkripsi dan target protein antigenik yang menjanjikan untuk pengembangan obat untuk pengobatan berbagai patologi seperti kanker, radang, penyakit kekebalan tubuh dan lainnya) (Kavita Vermani, Sanjay Garg. 2002) Proteasome adalah Kompleks protease multikatalitik yang memainkan peran penting degradasi protein intraselular. Bagian arecoline telah dianggap sebagai substrat potensial untuk katalitik threonine yang hadir di bagian peptida berasal dari protease (RZ Orłowski.1999). Proteasom urutan tripeptidik katalitik dari kedua N-dan turunan terminal C ditemukan untuk mengikat dengan turunan arecoline (M Marastoni et.al.2004).

21. Aktivitas moluska: *In vivo* dan *in vitro*

Paparan arecoline (komponen aktif *Biji areca catechu*) secara signifikan menghambat acetyl-cholinesterase (AChE), asam dan basa fosfatase (ACP / ALP) aktivitas dalam gugup tisu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa arecoline paling efektif dan sangat bisa menurunkan jumlah obat bila digunakan bersamaan.(Q Feng, G Li, Y Yang, J Gao, 1999)

2.1.5 Penelitian menggunakan biji pinang

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lee & Choi (1999) menyebutkan bahwa ekstrak etanolik buah pinang memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan IC50 sebesar 45,4 μ g/ml. Aktivitas antioksidan yang terdapat dalam ekstrak etanolik pinang ini berkorelasi positif dengan pencegahan kanker (Meiyanto et al., 2008), ekstrak etanolik tumbuhan ini tidak menginduksi perubahan kromosom (Wang CK. & Lee, 1996). Arekolin (C₈H₁₃NO₂) merupakan alkaloid utama yang terdapat dalam biji pinang dan menjadi alkaloid terpenting dalam fisiologinya, selain arekolidin, arekain, guvakolin, guvasin, dan isoguvasin (Awang, 1986; Jaiswal et al., 2011). Biji segar mengandung kira-kira 50% lebih banyak alkaloid dibandingkan dengan biji yang telah mengalami perlakuan, selain itu konsentrasi flavonoid dalam biji pinang menurun seiring dengan bertambahnya kematangan buah (Dalimartha, 2009). Tumbuhan pinang memiliki banyak manfaat diantaranya air rebusan dari biji pinang digunakan oleh masyarakat Desa Semayang Kutai-Kalimantan Timur untuk mengatasi penyakit seperti haid dengan darah berlebihan, hidung berdarah (mimisan), koreng, borok, bisul, eksim, kudis, difteri, cacangan (kremit, gelang, pita, tambang), mencret dan disentri, bahkan di India, pinang telah digunakan sebagai obat rumahan oleh masyarakatnya untuk mengobati berbagai macam penyakit (Oudhia, 2003). Biji pinang yang aromatis memiliki efek antioksidan dan antimutagenik, astringent (bersifat menyitutkan), serta bersifat memabukkan, sehingga telah lama digunakan sebagai taeniafuge untuk mengobati cacangan (Wang & Lee, 1996), selain itu pinang digunakan

juga untuk mengatasi bengkak karena retensi cairan (edema), rasa penuh di dada, luka, batuk berdahak, diare, terlambat haid (menstruasi), keputihan, beri-beri, malaria, dan memeperkecil pupil mata (Kristina & Syahid, 2007). Masyarakat India di daerah Chhatti sgarh sering mempergunakan biji pinang sebagai obat erysipelas (luka bakar), untuk mendinginkan luka bakar tersebut (Oudhia, 2001). Zat fenolik yang terdapat dalam ekstrak biji pinang diketahui memiliki aktivitas antioksidan, methanol dari ekstrak biji pinang dari berbagai rentang usia memberikan aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan bagian lainnya dari tumbuhan tersebut (daun, ujung batang, kulit buah (empat dan delapan bulan), akar dan akar adventitif). Aktivitas antioksidan methanol dari ekstrak biji buah pinang dari yang terendah hingga yang tertinggi berturut-turut didapatkan dari biji pada usia 4, 8, 6, 3, 2, dan 1 bulan. 82,05% aktivitas antioksi dan diperoleh dari senyawa fenolik pada pinang, sedangkan arekolin diindikasikan tidak memiliki aktivitas antioksidan (Wetwitayaklung et al.,2006). Ekstrak etanolik biji buah pinang memiliki efek antiproliferatif dengan menghambat pertumbuhan dan memacu apoptosis sel (Meiyanto et al., 2008). Arekolin selain berfungsi sebagai obat cacing juga sebagai penenang, sehingga bersifat memabukkan bagi penggunaanya (Grieve, 1995). Biji buah pinang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen sitotoksik yang dapat dikombinasikan dengan agen kemoterapi sehingga mampu meningkatkan sensitivitas sel kanker. Tumbuhan pinang berpotensi anti kanker karena memiliki efek antioksi dan, dan antimutagenik (Meiyanto et al.,2008). Biji dan kulit biji bagian dalam dapat juga digunakan

bersamasama dengan sirih untuk menguatkan gigi goyah. Air rendaman biji pinang muda digunakan untuk obat sakit mata oleh suku Dayak

Kendayan di Kecamatan Air Besar, Kalimantan Barat (Kristina & Syahid, 2007; Taman Nasional Alas Purwo, 2010).

2.1.6 Efek Apoptosis ekstrak biji pinang pada Sel

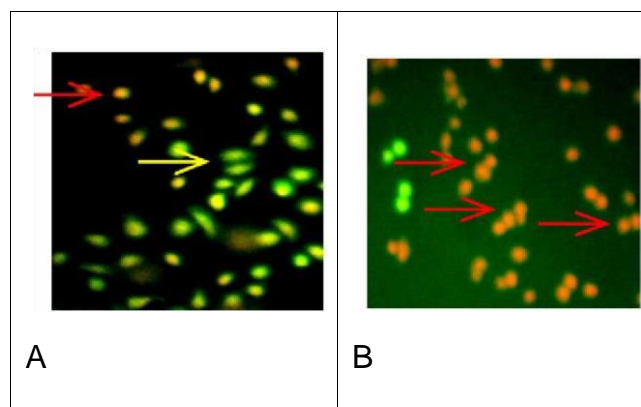
Kematian sel terprogram (PCD) adalah proses aktif secara fisiologis yang penting untuk berfungsinya jaringan kehidupan. Hormon steroid memodulasi program pada organ dan jaringan imunologis dan reproduksi, seperti kelenjar timus, selenium, uterus, vagina, testis, kelenjar ovarium dan prostat. Pengaruh hormon steroid pada kematian sel adalah jaringan spesifik; Hormon yang sama dapat menghambat PCD dalam satu jaringan, dan dapat meningkatkan PCD di jaringan lain. Peran apoptosis dan diferensiasi terminal telah diperiksa, dan regulasi PCD dengan hormon steroid, dinilai. (Pushkala K, Gupta PD. 2001)

Kematian sel terprogram (PCD) merupakan sistem yang sangat efisien dan sangat canggih untuk menghilangkan sel dari lingkungan sekitar. Sama mematikannya, PCD sangat penting untuk menghilangkan sel-sel yang menyimpang dan kelangsungan hidup organisme hidup secara keseluruhan. Oleh karena itu, PCD dikontrol dengan cermat, dan di antara pelaku peraturan utama termasuk hormon lipofilik kecil yang bertindak sebagai ligan anggota superfamili reseptor nuklir. Secara umum, hormon yang meliputi steroid, tiroid, retinoid, turunan vitamin D3, berperan penting dalam pemeliharaan homeostasis. Misalnya,

steroid mengatur metabolisme, reproduksi, dan perkembangan pada hewan yang berbeda seperti serangga dan manusia. Selama pengembangan hewan, steroid memicu respons yang berbeda termasuk diferensiasi sel dan kematian sel terprogram. Dengan demikian, hormon telah dikaitkan dengan banyak masalah kesehatan manusia, dan kekurangan hormon yang dipicu kematian sel terprogram dapat terjadi misal gangguan degeneratif. Pada organisme vertebrata dan invertebrata di mana steroid termasuk androgen, estrogen, progesteron, glukokortikoid dan ecdysteroids mengatur kematian sel, studi intensif terhadap proses ini telah menghasilkan banyak informasi baru mengenai bagaimana hormon lipofilik kecil berkontribusi terhadap kematian sel di dalam organisme. Ada banyak pengetahuan tentang fase eksekusi apoptosis, bentuk kematian sel terprogram yang paling sering, dan pada variasi indusernya. Meskipun kita akan meninjau juga kemajuan terbaru pada topik berbagai ligan kecil dalam peran induser, Mekanisme yang menghubungkan tindakan hormon dengan pengaktifan eksekusi apoptosis, kompleks proses, yang kurang dipahami sejauh ini. (Kucharova S, Farkas R. 2002)

Ekstrak biji pinang memberi efek fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis pada sel. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan EP menyebabkan terjadinya apoptosis yang dimulai hilangnya permeabilitas membran pada beberapa sel. Akibatnya *etidium bromide* dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluoresensi oranye sebagai indikator kematian sel. (Meiyanto E, 2010). Paparan alkaloida-alkaloida yang terkandung dalam ekstrak biji pinang

kemungkinan menyebabkan kerusakan DNA sel-sel jaringan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Sinha dan Rao (1985) bahwa *arecoline* sebagai alkaloida utama biji pinang dapat menyebabkan kerusakan DNA sel-sel germinal. Kerusakan DNA suatu sel menyebabkan sel menjadi stress dan ini memicu sel untuk melakukan proses apoptosis. EP akan memacu apoptosis. Apoptosis diukur sebagai caspase 3/7. (Friebert PA, 2009)



Gambar 3. Efek Arekolin 175 μ M (A) sel hidup berfluoresensi hijau (B) sel mati berfluoresensi oranye (Astrid Ayu Maruti, *et.al*)

Pengamatan apoptosis Sel hidup akan berfluorosensi hijau terang (dengan akridin oranye), sel yang mengalami apoptosis tahap awal akan mengalami kondensasi kromatin dan masih berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis pada tahap akhir akan terpecah-pecah menjadi bagian yang lebih kecil dan berwarna oranye (dengan etidium bromida)(Renvoize, *et al.*, 1998). Pengamatan terhadap morfologi sel setelah perlakuan arekolin tunggal menunjukkan jumlah sel yang mengalami kematian (sel berbentuk bulat dan melayang) meningkat sesuai murah konsentrasi arekolin yang diberikan. Uji sitotoksik tunggal

arekolin pada sel HeLa menunjukkan aktivitas sitotoksik arekolin terhadap sel HeLa meningkat seiring peningkatan dosis. Uji ini menghasilkan IC 50 yang besar yaitu sebesar 462 μ M. Nilai IC 50 ini menunjukkan arekolin tidak memiliki efek sitotoksik yang kuat terhadap sel HeLa seperti alkaloid lain skimmianin, flindersin, dan haplopin (Jansen, et.al., 2006). Arekolin juga bisa menginduksi *untai DNA break* pada sel mamalia (Chang, et al., 2009). Arekolin turunkan produksi interleukin-6 dan menghambat fosforilasi STAT3 sehingga produksi protein Bcl-XL dan Bcl-2 menurun (Chang, et al., 2004). Selain itu, arekolin juga terbukti menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi p53, meningkatkan aktivitas caspase 3, dan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria pada sel hepatoma HA22T / VGH (Cheng, dkk., 2007). Pengikatan p53 oleh E6 mengakibatkan degradasi peningkatan kecepatan degradasi protein tersebut. Arekolin mampu meningkatkan ekspresi p53 serta meningkatkan ekspresi gen pengkode p21WAF1 (Chou, et al., 2009). Mekanisme antikanker arekolin adalah melalui induksi apoptosis. Arekolin juga dapat menginduksi *DNA strand break* pada sel mammalian (Chang, et al., 2009).

Efek Hipoglikemik ekstrak biji pinang

Arecoline diselidiki dan dilaporkan memiliki aktivitas hipoglikemik di model hewan diabetes pada subkutan administrasi. Administrasi subkutan dari fraksi alkaloid dari *Areca catechu* menjadi alloxanized.

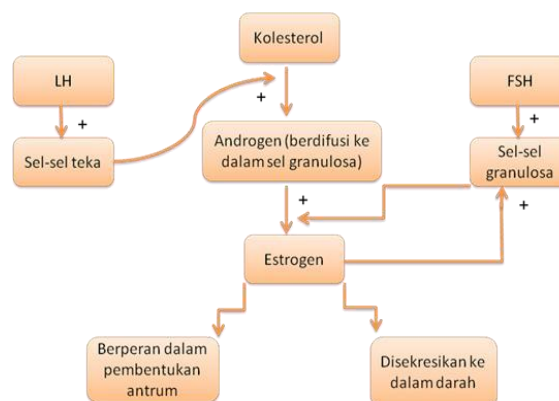
Efek hipoglikemik yang signifikan berlangsung selama 4/6 jam (B

Chempakam.1993). Ekstrak arecanut memiliki α -glukosidase yang manjur inhibitor dan akan efektif dalam penekanan elevasi glukosa darah setelah oral pemberian maltosa pada tikus (M Senthil Amudhan, V. Hazeena Begum. 2008). Glukosa merupakan sumber energi esensial yang digunakan untuk berbagai proses metabolisme. Glukosa merupakan substrat dari proses glikolisis yang selanjutnya akan di teruskan ke siklus krebs. Glukosa dapat bekerja pada dua sel yang berbeda yaitu sel otot dan sel lemak. Di sel lemak glukosa di gunakan untuk sintesi trigliserida yang berperan penting sebagai sumber energi. Hasil penelitian David R Garris, et.al (1985) menyimpulkan perubahan penggunaan glukosa oleh jaringan saluran reproduksi sensitif steroid dapat mendasari terganggunya kemampuan reproduksi. Insulin merupakan kunci yang membuka pintu sel jaringan, memasukkan gula dalam sel dan menutup pintu kembali. Insulin merangsang produksi androgen ovarium (Callum LIVINGSTONE, et.al.2002) Ada Korelasi yang signifikan antara kadar basal insulin plasma, androstenedion, dan testosteron, ditemukan antara daerah respon insulin plasma dan testosteron. Hiperandrogenisme berkorelasi dengan hiperinsulinisme. (George A.1980). Estradiol (E₂) mempengaruhi pemanfaatan glukosa dalam rahim tikus (Smith,1967) berasal dari kenaikan sintesis protein transport (Smith & Gorski 1968) Efek hormon ovarium steroid terhadap pengikatan insulin dan metabolisme glukosa yang distimulasi insulin pada otot soleus. Ovariectomi dikaitkan dengan penurunan (29%) pada serapan 2-deoxyglucose yang dirangsang oleh insulin, sementara E₂ sendiri menghasilkan peningkatan 2 kali lipat dalam serapan 2-deoksi glukosa insulinstimulasi, oksidasi glukosa, dan glikogenesis (Jennifer A.1985) P saja

tidak secara signifikan mengubah parameter metabolisme glukosa, namun P antagonis efek E_2 ketika kedua hormon diberikan dalam kombinasi. E_2 mempromosikan pengambilan dan penggunaan glukosa insulin dimediasi pada otot rangka. (Jennifer A.1985) Hyperinsulinaemia diyakini dapat merangsang produksi androgen ovarium, Dasar molekuler dari resistensi insulin ini telah dilaporkan melibatkan pengurangan autofosforilasi reseptor insulin, ekspresi dan translokasi yang berkurang dari transporter glukosa responsif insulin dan cacat jalur sinyal insulin yang distal terhadap reseptor insulin (Callum LIVINGSTONE, et.al.2002)

2.1.8 Efek hipolipidemia ekstrak biji pinang

Ekstrak buah pinang ditemukan menunjukkan aktivitas penghambatan kolesterol yang kuat pada tikus dengan kadar kolesterol tinggi. Dalam studi lain, tikus diberi makan makanan yang mengandung minyak jagung dengan pinang ekstrak suplemen Suplementasi dari ekstrak arecanut secara signifikan menurunkan penyerapan trigliserida dan lipid plasma konsentrasi (Byun SJ. *et.al.* 2001).



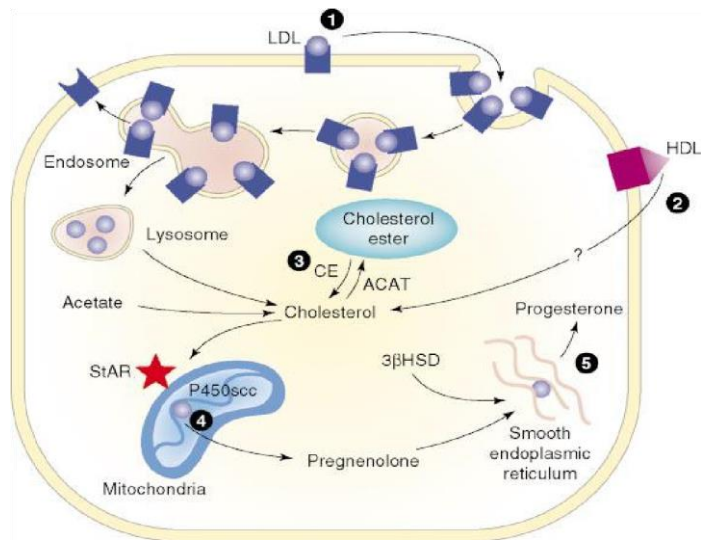
Gambar 4 : Sintesis kolesterol

Kolesterol yang digunakan untuk sintesis steroid oleh jaringan ovarium dapat berasal dari sintesis serapan seluler kolesterol lipoprotein.

Mayoritas kolesterol darah diangkut dengan lipoprotein densitas rendah (LDL) atau tinggi (HDL), tergantung pada spesies hewan. Sebelum vaskularisasi, hanya HDL yang berada dalam cairan folikuler dan memberi kontribusi sterol pada sel granulosa karena lipoprotein lain tidak dapat melintasi membran dasar karena massa molekulnya.

Setelah vaskularisasi, baik LDL dan HDL memandikan sel luteal. Sebagian besar spesies secara khusus menggunakan kolesterol LDL sebagai prekursor sintesis steroid ovarium. Serapan LDL oleh jaringan ovarium terjadi oleh endositosis yang dimediasi reseptor. Reseptor mengenali apolipoprotein B dari LDL dan apolipoprotein E ditemukan pada beberapa, tapi tidak semuanya, HDL. Dalam sebuah spesies, ada hubungan positif antara kandungan HDL apolipoprotein E dan pentingnya kolesterol HDL sebagai prekursor untuk steroidogenesis. Kolesterol yang digunakan untuk sintesis steroid oleh jaringan ovarium dapat berasal dari sintesis serapan seluler kolesterol lipoprotein.

Mayoritas kolesterol darah diangkut dengan lipoprotein densitas rendah (LDL) atau tinggi (HDL), tergantung pada spesies hewan.



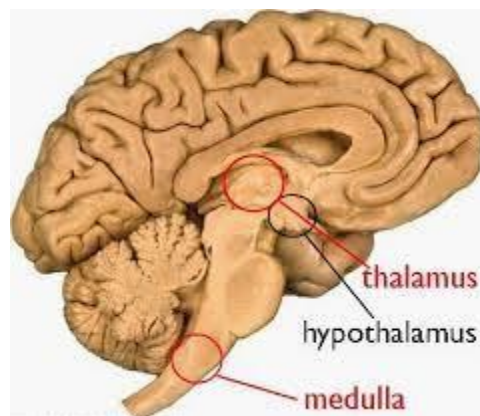
Gambar 5. Jalur biosintesis progesteron pada sel luteal generik. Tiga sumber kolesterol bisa digunakan sebagai substrat: (1) low density lipoprotein (LDL); (2) high density lipoprotein (HDL); atau (3) hidrolisis dari esterase kolesterol yang tersimpan dengan kolesterol esterase (CE). Kolesterol bebas diangkut ke Mitokondria rupanya dengan keterlibatan unsur sitoskeletal dan protein pembawa sterol. Kolesterol kemudian diangkut dari luar ke membran mitokondria bagian dalam, dan proses ini tampaknya melibatkan steroidogenic akut regulatory protein (StAR), tipe perifer benzodiazepine reseptor dan endozepin. Kolesterol diubah menjadi pregnancyenolone oleh cytochrome P450_{scc} (4), diangkut keluar dari mitokondria dan diubah menjadi progesteron dengan-hidroksysteroid dehidrogenase, $\square 5$, $\square 4$ isomerase ($3\square$ -HSD) (5) yang hadir dalam retikulum endoplasma halus. Progesteron tampak berdifusi dari sel luteal. ACAT: asil koenzim A: kolesterol asiltransferase. (Gordon D. Niswender. 2002)

Setidaknya tiga protein penting telah diidentifikasi terlibat dalam pengangkutan kolesterol dari luar ke membran mitokondria bagian dalam. Ketiga protein Star, reseptor benzodiazepin tipe perifer (PBR) dan endozepin, ligan alami untuk PBR. (Gordon D. Niswender. 2002)

2. 2 Pengendalian Hormon Reproduksi Betina

2.2.1 Hipotalamus

Hipotalamus terletak di permukaan bawah otak. Itu terletak tepat di bawah thalamus dan di atas kelenjar pituitari, yang terpasang dengan tangkai. Ini merupakan bagian yang sangat kompleks dari otak mengandung banyak daerah dengan fungsi yang sangat khusus. Pada manusia, hipotalamus adalah sekitar ukuran kacang polong dan menyumbang kurang dari 1%



Gambar 6: hipotalamus

<http://fungsi.web.id/2014/10/perbedaan-antara-talamus-dan-hipotalamus.html>

Fungsi hipotalamus

Salah satu fungsi utama dari hipotalamus adalah untuk mempertahankan homeostasis, yaitu, untuk menjaga tubuh manusia di sebuah kandang, kondisi konstan. Hipotalamus merespon berbagai sinyal dari lingkungan internal dan eksternal termasuk suhu tubuh, rasa lapar, perasaan yang penuh setelah makan, tekanan darah dan kadar hormon dalam sirkulasi. Hipotalamus mengumpulkan dan menggabungkan informasi ini dan menempatkan perubahan di tempat untuk memperbaiki ketidakseimbangan. (<http://fungsi.web.id/2014/10/perbedaan-antara-talamus-dan-hipotalamus.html>)

Hormon yang dihasilkan hipotalamus

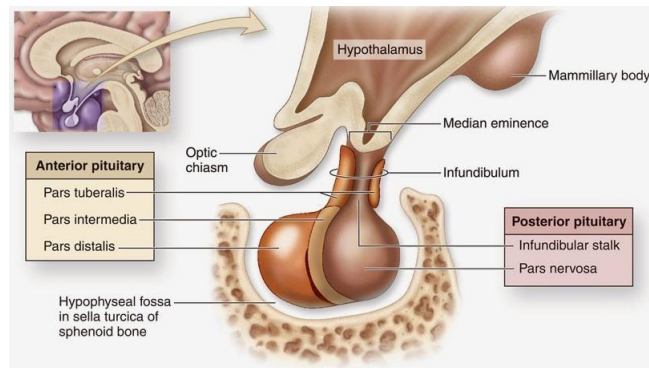
Ada dua set sel-sel saraf di hipotalamus yang menghasilkan hormon. Satu set mengirimkan hormon yang mereka hasilkan turun melalui tangkai hipofisis ke lobus posterior kelenjar hipofisis di mana hormon ini dilepaskan langsung ke aliran darah.

Set lain sel saraf menghasilkan merangsang dan menghambat hormon yang mencapai lobus anterior dari kelenjar pituitari melalui jaringan pembuluh darah yang berjalan ke bawah melalui tangkai hipofisis. Ini mengatur produksi hormon yang mengontrol gonad, kelenjar tiroid dan adrenal korteks, serta produksi hormon pertumbuhan, yang mengatur pertumbuhan, dan prolaktin. Salah satu hormon yang disekresikan oleh hipotalamus dan sangat berpengaruh dalam sistem reproduksi adalah *Gonadotrophin Releasing Hormon (GnRH)*. GnRH yang diproduksi oleh neuron hipotalamus tersebut dibawa menuju anterior pituitari oleh

pembuluh darah portal berikatan dengan reseptor GnRH ulang (GnRHr) pada permukaan sel gonadotrophin untuk merangsang perpaduan dan melepaskan LH dan FSH. LH dan FSH bertindak pada ovarium dan testis untuk merangsang spermatogenesis, folikulogenesis dan, pada wanita, LH memicu ovulasi (*Brown P and Mc.Neilly A.S. 1999*). Hormon ini dianggap sebagai perantara akhir utama bagi semua pengaruh reproduksi untuk disampaikan pada sistem saraf pusat. GnRH yang dilepaskan dalam darah secara teratur pada reseptornya pada pituitari. (*Sacher dan McPerson, 2002; Robertson dan Williams, 2009*).

2.2.2 Hipofisis

Hipofisis memiliki 2 lobus yang secara anatomis dan fungsional berbeda, hipofisis posterior dan hipofisis anterior. Hipofisis posterior terdiri dari jaringan saraf dan karenanya juga dinamai neurohipofisis. Hipofisis anterior terdiri dari jaringan epitel kelenjar dan karenanya juga dinamai adenohipofisis (adeno berarti —kelenjarll). (*Guyton & Hall. 2007*) Hipotalamus dan hipofisis anterior membentuk suatu sistem neuroendokrin yang terdiri dari suatu populasi neuron neurosekretorik yang badan selnya terletak di dua kelompok di hipotalamus (nukleus supraoptika dan nukleus paraventrikel). Secara fungsional dan anatomis, hipofisis posterior sebenarnya hanya perpanjangan dari hipotalamus.



Gambar 7 : Hipofisis

Hipofisis anterior membentuk hormon sendiri yang kemudian akan dibebaskan dalam darah. Berbagai populasi sel dalam hipofisis anterior mengeluarkan enam hormon peptida utama. Sel-sel asidofil dan basofil hipofisis anterior berperan dalam memproduksi hormon LH dan FSH. (Pratomo H., 2013)

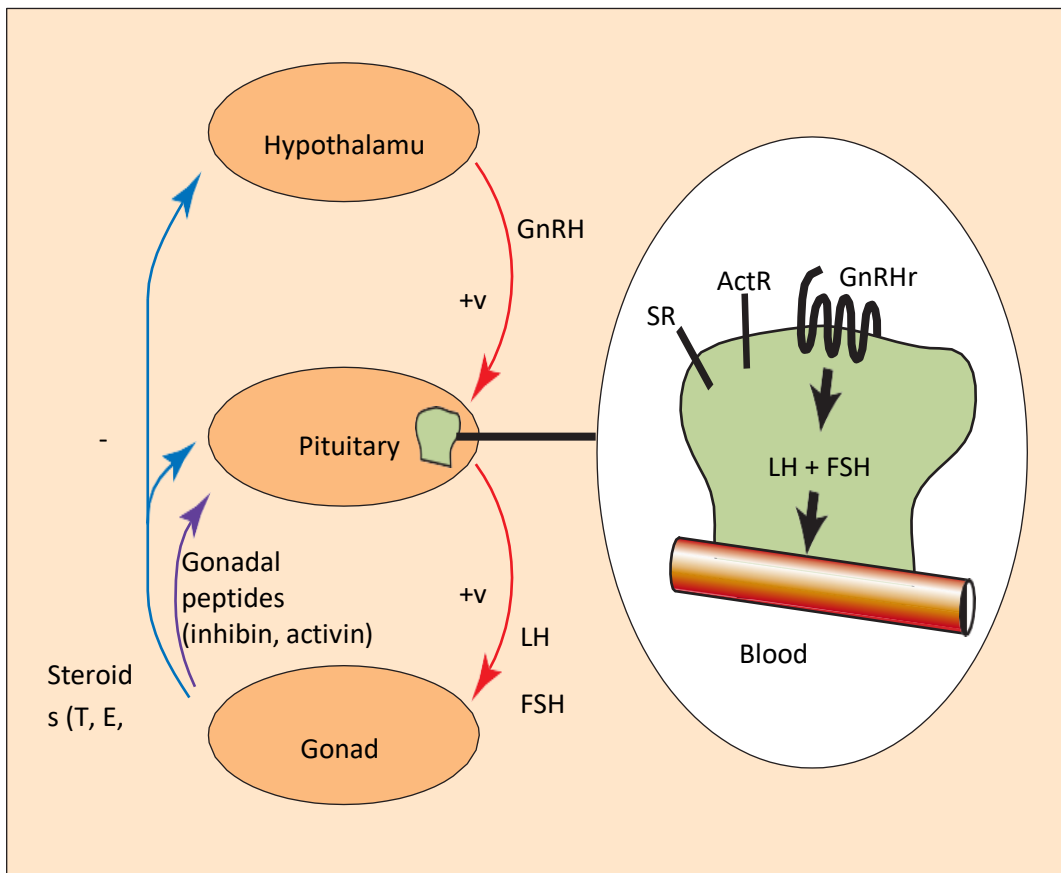
Hormon gonadotropin yang di keluarkan hipofisis adalah:

Follicle-stimulating hormone (FSH) merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium, tempat berkembangnya ovum atau sel telur serta mendorong sekresi hormon estrogen oleh ovarium.

Luteinizing hormone (LH) pembentukan korpus luteum penghasil hormon di ovarium setelah ovulasi serta mengatur hormon estrogen dan progesteron (Thackray VG., 2014.).

Gonadotropin, hormon luteinizing (LH) dan follicle-stimulating hormone (FSH), yang diproduksi secara eksklusif dalam sel gonadotropin dari hipofisis anterior dan disekresikan ke dalam darah di mana mereka mengatur steroidogenesis dan gametogenesis dalam gonad (Burns dan Matzuk, 2002). Sintesis dan sekresi LH dan FSH dipengaruhi oleh GnRH. Sintesis dan sekresi LH dan FSH yang diatur baik secara positif

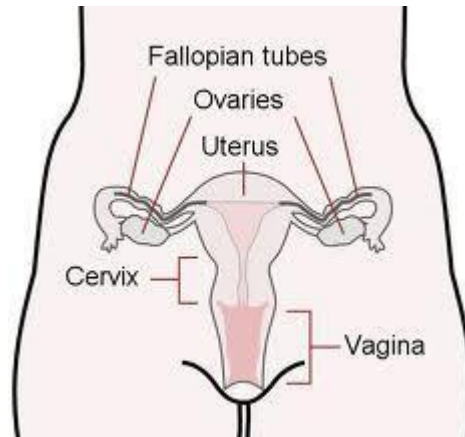
maupun negatif oleh steroid dan gonad peptida (*Brown P and Mc.Neilly A.S. 1999*).



2. 2.3 Ovarium

Ovarium merupakan bagian dari sistem reproduksi wanita. Ovarium adalah organ reproduksi perempuan, atau organ penghasil sel jenis kelamin, yang menghasilkan telur, atau ovum. Setiap wanita memiliki dua ovarium. Bentuknya oval, sekitar empat sentimeter panjang dan berbaring di kedua sisi rahim (uterus) terhadap dinding panggul di daerah yang dikenal sebagai fossa ovarium, ukuran ovarium kira-kira empat sentimeter kubik, yang adalah kira-kira seukuran kenari. Ovarium berada di ujung tabung rahim, yang merupakan tabung koneksi yang

menempel pada rahim. Dalam tubuh wanita, indung telur (dan organ reproduksi lainnya) terletak di rongga abdominopelvic.



Gambar 9 Letak ovarium

Fungsi Ovarium

Meskipun ovarium cukup kecil, fungsinya sangat penting dalam reproduksi secara keseluruhan dari tubuh wanita. Banyak fungsi yang baik secara langsung dikendalikan atau tidak langsung dipengaruhi oleh indung telur.

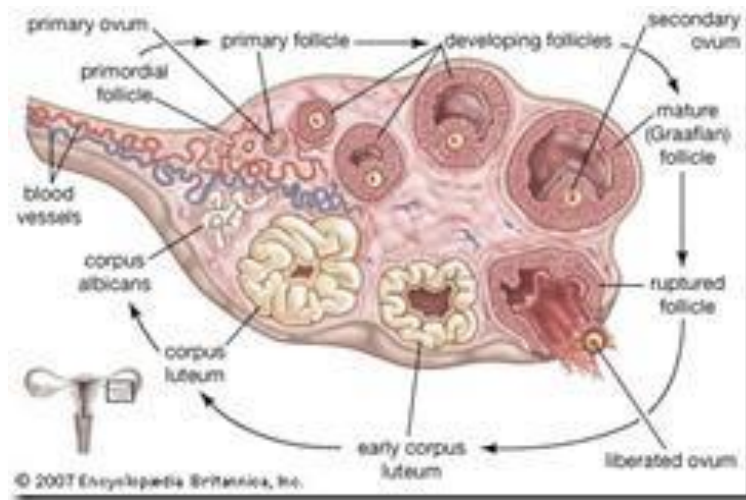
Beberapa fungsi ovarium:

Oogenesis

Oogenesis adalah proses dimana tubuh wanita memproduksi telur. Proses ini terjadi sebelum kelahiran, dan setiap anak perempuan dilahirkan dengan semua telur yang dia perlukan untuk hidupnya. Oogenesis adalah bentuk meiosis, atau reproduksi sel seks. Setiap telur akan memiliki 23 kromosom, yang merupakan $\frac{1}{2}$ dari total jumlah yang diperlukan bagi manusia untuk berkembang dengan baik. Demikian juga, sel sperma memiliki 23 kromosom, dan ketika telur dan sperma bersatu, jumlah kromosom penuh akan dipulihkan.

Ovulasi

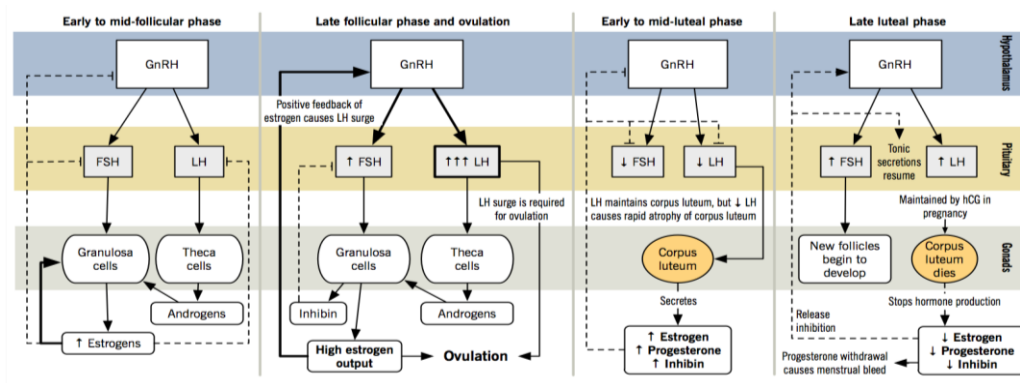
Ovulasi adalah interaksi dari hipotalamus – hipofise – ovarium dan endometrium. Perkembangan folikel ovarium terjadi sebagai akibat dari stimulasi hormon yang dihasilkan oleh kelenjar hipofise. Hipotalamus dan hipofise merupakan organ yang saling terkait. Secara bersamaan keduanya mengatur struktur dan fungsi ovarium melalui siklus menstruasi. Dalam ovarium, semua telur yang awalnya tertutup dalam satu lapisan sel yang dikenal sebagai folikel. Seiring waktu, telur ini mulai matang sehingga satu dilepaskan dari ovarium pada setiap siklus menstruasi. Agar telur bersatu dengan sel sperma, terlebih dahulu harus dilepaskan dari ovarium. Ovarium melepaskan sel telur ke dalam saluran rahim selama ovulasi. Proses ini sebagian besar dikontrol oleh dua hormon yang dikenal sebagai folikel stimulating hormone, atau FSH, dan hormon luteinizing, atau LH. Selama siklus menstruasi, ovulasi biasanya terjadi sekitar hari ke 14 dari jangka waktu 28 hari. Pada saat ini, FSH dan LH akan meningkat, dan ini akan merangsang pelepasan telur. Hanya oosit tunggal dari satu ovarium dilepaskan selama setiap siklus menstruasi, dengan masing-masing ovarium mengambil giliran alternatif dalam melepaskan telur.



Gambar 10 : Ovulasi

Produksi hormon

Ovarium menghasilkan oosit (telur) untuk pemupukan dan menghasilkan hormon reproduksi, estrogen dan progesteron. Produksi estrogen mendominasi di paruh pertama siklus menstruasi sebelum ovulasi, dan produksi progesteron mendominasi pada paruh kedua siklus menstruasi saat korpus luteum telah terbentuk. Progesteron dan estrogen adalah hormon yang bekerja sama untuk mempertahankan pertumbuhan rahim untuk mempersiapkan kehamilan yang potensial. Gangguan kelenjar pituitari dapat mempengaruhi fungsi ovarium normal karena kurangnya hormon yang dilepaskan dari kelenjar pituitari akan mengurangi stimulasi produksi hormon dan perkembangan folikel dalam ovarium.



Gambar 11 : Peraturan hormonal di berbagai bagian dari siklus menstruasi
<http://www.pathophys.org/wp-content/uploads/2013/03/menstrualcycle.png>

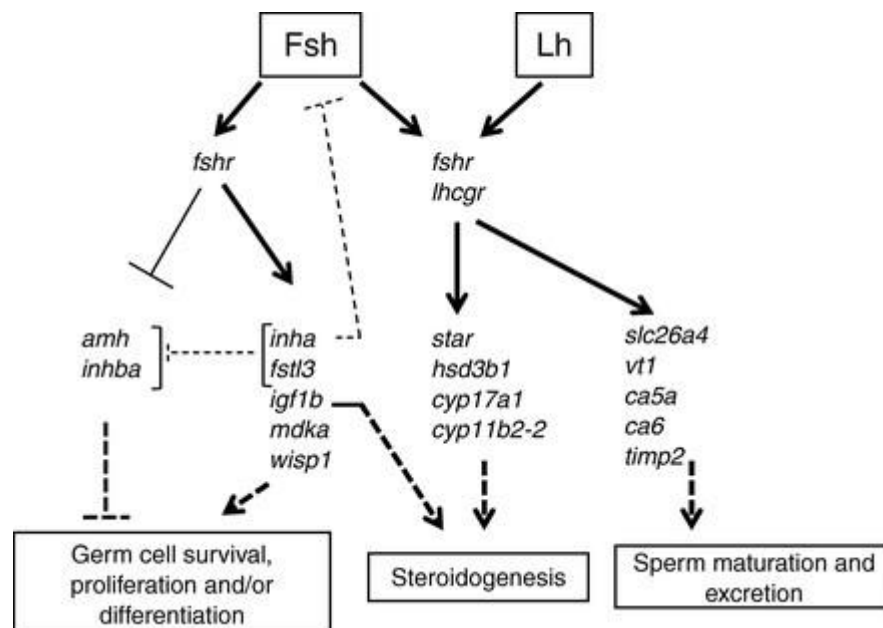
2.2.4 Reseptor Hormon

Konsentrasi hormon dalam cairan ekstrasel sangat rendah berkisar 10^{-15} – 10^{-9} . Sel target harus membedakan antara berbagai hormon dengan konsentrasi yang kecil, juga antar hormon dengan molekul lain. Derjad pembeda dilakukan oleh molekul pengenal yang terikat pada sel target disebut Reseptor. (Indah M. 2004).

Reseptor Hormon: Molekul pengenal spesifik dari sel tempat hormon berikatan sebelum memulai efek biologiknya. Umumnya pengikatan Hormon Reseptor ini bersifat reversibel dan nonkovalen. Reseptor hormon bisa terdapat pada permukaan sel (membran plasma) atau pun intraselluler.

Interaksi hormon dengan reseptor permukaan sel akan memberikan sinyal pembentukan senyawa yang disebut sebagai *second messenger* (hormon sendiri dianggap sebagai *first messenger*). Jika hormon sudah berinteraksi dengan reseptor spesifiknya pada sel-sel target, maka

peristiwa-peristiwa komunikasi intraseluler dimulai. Hal ini dapat melibatkan reaksi modifikasi seperti fosforilasi dan dapat mempunyai pengaruh pada ekspresi gen dan kadar ion. Peristiwa-peristiwa ini hanya memerlukan dilepaskannya zat-zat pengatur (Indah M. 2004). Reseptor gonadotropin milik keluarga besar G protein-coupled receptors, yang melintasi membran plasma dengan tujuh domain heliks dan memiliki ujung amino ekstraseluler dan karboksil ujung intraseluler. Reseptor LH dan FSH bertanggung jawab atas transduksi tindakan biologis LH dan FSH pada sel-sel target mereka, menggunakan cAMP sebagai utama, meskipun tidak satu-satunya, intraseluler utusan kedua (Patsoula E. et al. 2001).



Gambar 12 : Skema representasi dari fungsi prediksi Fsh- dan / atau gen Lh-dependent. FSH dan LH merangsang gen reseptor gonadotropin. Aktivasi jalur sinyal hilir menyebabkan stimulasi (panah) atau penghambatan (rusak line) dari gen. Fsh memodulasi gen yang telah terbukti untuk mengatur kelangsungan hidup sel germinal, proliferasi,

dan/atau diferensiasi. Gen yang terlibat dalam steroidogenesis dan sperma pematangan / ekskresi diatur oleh kedua gonadotropin. Selain berperan dalam regulasi parakrin proliferasi sel germinal, regulasi positif dari Inha oleh Fsh (dan Lh) menunjukkan bahwa inhibin bisa mengerahkan umpan balik negatif pada rilis Fsh seperti yang ditunjukkan pada mamalia (*Sambroni E., et al*).

2.3 Endokrinologi reproduksi.

Definisi klasik dari hormon adalah suatu senyawa yang diproduksi oleh jaringan khusus yang dilepaskan ke aliran darah dan berjalan jauh menuju sel spesifik dimana hormon akan memberikan efek spesifiknya. Apa yang dulunya dianggap sebagai perjalanan sederhana kini terungkap sebagai perjalanan panjang dan menjadi semakin kompleks pada saat berbagai hasil penelitian di dunia tidak mampu menjelaskannya secara rinci, bahkan pengertian hormon yang hanya dihasilkan oleh jaringan spesifik kini menjadi sangat dipertanyakan. Kompleks hormon dan resptornya kini ditemukan pada organisme sel tunggal primitif, dan ini menggambarkan bahwa kelenjar endokrin sebenarnya merupakan hasil evolusi yang berkembang sangat lambat kemudian. Kemampuan yang begitu luas dari berbagai sel untuk memproduksi dan berreaksi terhadap hormon, menimbulkan kenyataan yang tidaklah mengherankan apabila sel kanker dapat menghasilkan hormon, karena pada dasarnya setiap sel memiliki gena yang dapat mengekspresikan hormon, tergantung pada diferensiasinya dan lingkungannya. Kini, hormon dan neurotransmitter sebenarnya harus dipandang sebagai alat komunikasi atau regulator kimiawi dan signal. Peran hormon kini tidak hanya sebagai senyawa endokrin, namun juga parakrin, autokrin atau intrakrin. Karena fungsi komunikasinya, maka

fungsi setiap signal akan dipengaruhi oleh bagaimana signal tersebut disintesis, dilepaskan, berjalan menuju target reseptor (transport), berikatan dengan reseptor, menimbulkan reaksi/efek biologis dan mengalami degradasi atau dihentikan efeknya. Sebagai contoh pada system reproduksi, kini kita ikuti perjalanan estradiol dalam melakukan fungsinya, mulai dari bagaimana diproduksinya, dilepaskannya, ditransport, mekanisme efeknya (ikatan dengan reseptor dan efek paska ikatan reseptor), dan metabolismenya. Estradiol memulai perjalanan hidupnya dengan disintesisnya pada sel spesifik yang memiliki enzim dan precursor yang sesuai untuk steroidogenesis, suatu proses pembentukan hormon steroid. Pada wanita dewasa sumber utama estradiol adalah sel-sel granulosa dari folikel yang sedang berkembang dan korpus luteum. Proses steroidogenesis memerlukan stimulasi dari gonadotropin, *Follicle-stimulating hormone* (FSH) dan *Luteinizing hormone* (LH). Pesan yang dibawa oleh signal gonadotropin harus ditransmisikan melalui membrane sel folikel atau korpus luteum, karena gonadotropin yang berupa glikoprotein besar tidak mampu menembus membran sel yang berupa lipid bilayer, namun akan berikatan dengan reseptor spesifiknya pada membrane sel. (Achmad TH. 2004) Reseptor LH adalah menyatakan di teka ovarium, granulosa dan sel luteal. Reseptor FSH dinyatakan hanya dalam sel granulosa ovarium. (Patsoula E. et al. 2001) Ikatan signalreseptor ini memulai suatu rangkaian proses komunikasi signal. Dimulai dengan diaktifkannya protein G, yang selanjutnya akan mengaktifkan enzim adenilat siklase . Enzim ini selanjutnya akan mengkatalisis pemecahan

ATP menjadi siklik adenosin monofosfat atau cAMP. cAMP sebagai pembawa pesan berikut dari proses komunikasi ini selajutnya akan menyebabkan terjadinya rangkaian reaksi sistesis hormon steroid, dalam hal ini estradiol. Proses transmisi pesan ini kini diketahui menjadi semakin kompleks dengan diungkapkannya peran berbagai molekul dalam proses fisiologi hormonal ini, termasuk heterogenitas dari molekul polipeptida pembawa signal dan reseptornya, regulasi dari ekspresi receptor pada membran sel, serta hubungannya dengan sistem signal lainnya. Respon target sel terhadap signal akan menurun manakala terjadi stimulasi yang terus menerus, hal ini setidaknya melibatkan 2 mekanisme, yaitu :

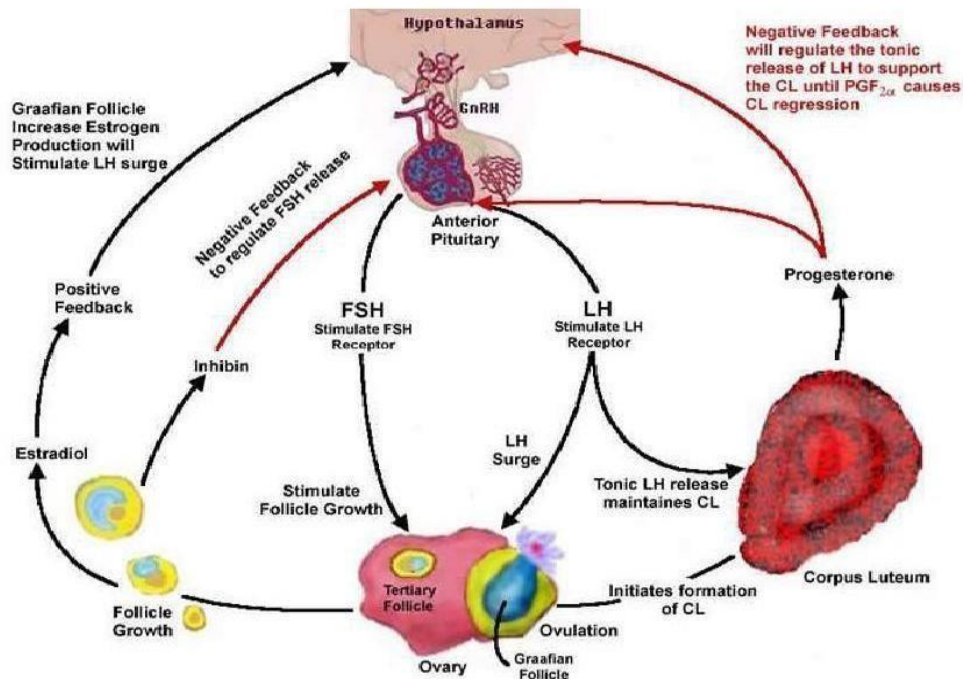
Desensitasi secara autofosforilasi dari segmen sitoplasmik dari reseptor Hilangnya kemampuan internalisasi dari reseptor, statu mekanisme yang berjalan lebih lamban. Sekresi estradiol ke aliran darah langsung terjadinya setelah proses sintesisnya. Begitu memasuki aliran darah, estradiol ada dalam dua bentuk, yaitu terikat pada protein transporternya, dan bentuk bebas. Kebanyakan dari estradiol ini terikat dengan protein pembawanya, yaitu albumin dan *sex steroid hormonebinding globulin*. Fungsi dari ikatan ini masih belum jelas sepenuhnya. Diduga adanya ikatan ini mencegah reaksi yang langsung dan ekstrim dari hormon ini begitu memasuki aliran darah, serta mencegah rusaknya hormon akibat reaksi metabolisme dengan berbagai senyawa yang ada pada aliran darah, sehingga signal hormonal ini akan mampu bertahan untuk mencapai target sel dan menghasilkan efek biologis yang dimaksud. Mekanisme yang menyerupai penyimpanan sementara ini menghindari efek fluktuasi

kadar hormon sehingga dapat memberikan aktifitas yang lebih stabil. Efek biologis dan metabolik dari suatu hormon ditentukan pula oleh kemampuan dari sel target untuk menerima dan mempertahankannya. Estradiol yang sudah tidak berikatan dengan transporternya begitu mendekati target sel akan langsung mampu menembus membrane sel yang merupakan lipid

bilayer, tidak seperti halnya signal polipeptida yang berikatan dengan reseptornya pada membran sel. Untuk dapat memberikan efek biologis, estradiol harus berikatan dengan reseptornya didalam sel. Ikatan steroid dengan reseptornya menyebabkan perubahan konformasi (alosterik) yang menghasilkan terbentuknya kompleks steroid-reseptor yang teraktifasi yang memiliki afinitas tinggi terhadap tempat ikatan DNA. Aktifasi akibat perubahan konformasi ini dapat terjadi akibat lepasnya ikatan kompleks ini dengan *heat shock protein-90* (hsp90). Proses aktifasi ini tidak hanya terjadi di sitoplasma namun juga pada kompartemen inti. Kompleks hormon-reseptor ini selanjutnya berikatan dengan daerah spesifik di DNA yang dikenal sebagai *hormone response element* (HRE), dan mengaktifasi atau menginaktifasi gena spesifik. Jadi peran kompleks hormon-reseptor ini adalah untuk membantu menyampaikan pesan yang dibawa oleh estradiol kedalam inti untuk mempengaruhi proses traskripsi sehingga dihasilkan *messenger RNA* (mRNA) yang berperan pada sintesis protein. mRNA ini selanjutnya akan ditransfer ke ribosom dan akhirnya akan terjadi sintesis protein di sitoplasma yang berperan menghasilkan aktifitas seluler spesifik. Protein spesifik yang dihasilkan inilah yang selanjutnya

akan menimbulkan efek spesifik dari signal estradiol. Kompleks hormon steroid-reseptor awalnya mempengaruhi transkripsi gen, namun selanjutnya juga berperan mengatur fase paska transkripsi dan kejadian non genomic lainnya. Kompleks steroid-reseptor mengatur transkripsi gen melalui mekanisme yang multipel yang tidak seluruhnya memerlukan interaksi langsung dengan DNA. Spesifisitas reaksi dari jaringan terhadap hormon steroid sex disebabkan oleh adanya reseptor protein intrasel. Setelah interaksinya dengan DNA, kompleks hormonereseptor ini akan mengalami perubahan yang belum dapat dimengerti seluruhnya, namun yang jelas akan terjadi disosiasi antara hormon dan reseptornya. Reseptor selanjutnya akan mengalami daur ulang dan hormone akan mengalami eliminasi dari sel. Selanjutnya setelah menimbulkan efek intraseluler, sel-sel yang mampu membersihkan estradiol dari sirkulasi darah akan mengakhiri proses komunikasi signal ini melalui rangkaian reaksi biokimiawi, dimana estradiol akan didegradasi dengan mengkonjugasinya menjadi senyawa yang lebih larut dalam air (melalui konjugasi sulfat dan glukoronat) sehingga dapat disekresikan melalui urin dan cairan empedu. Dari sini tampak bahwa hormon steroid memiliki perjalanan yang bervariasi dalam waktu hidupnya yang singkat. Disatu sisi produksi steroid hormon memerlukan stimulasi hormon polipeptida yang sistesisnya dikode oleh gena tersendiri, dan kaskade signal melibatkan reseptor dan berbagai protein atau molekul lainnya yang cukup kompleks. Disisi lain, sintesis dan transpor steroid yang menjadi peran utama endokrinologi reproduksi juga melibatkan berbagai molekul protein yang

berperan sebagai enzim atau transporter, yang sintesisnya juga dikode oleh gena tersendiri. (Achmad TH. 2004). Peranan hormon pada pengendalian target dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 13 : Peranan hormon terhadap organ target (Firman, 2011)

2.4 Siklus Reproduksi Mamalia Betina

Siklus Estrus

Estrus berasal dari kata Yunani yang dalam bahasa Inggris berarti

—*gadfly*ll, istilah untuk menyebut orang-orang yang berperilaku mengganggu, barangkali karena pengaruh libido seksual yang mengusik, mirip dengan sengatan lalat (*fly*) yang mengganggu.

Estrus berasal dari bahasa latin —*oestrus*ll yang berarti —kegilaanll atau —gairahll dimana pada fase ini merupakan satu-satunya waktu dimana terjadi perubahan pada vagina yang memungkinkan terjadinya perkawinan. Pengaruh musim dan iklim juga lebih kuat terhadap siklus

estrus. Estrus kadang-kadang disebut —heatll (panas) karena pada saat tersebut, suhu tubuh betina meningkat. Panjang dan frekuensi siklus reproduksi pada masing-masing organisme berbeda-beda. Pada tikus, siklus estrus berlangsung selama 5 hari. (*Campbell, N. Et al. 2004*) Panjang siklus estrus pada tikus adalah 4—5 hari (*Marcondes dkk. 2002: 602*).

Siklus reproduksi adalah proses berulang yang terjadi pada sistem reproduksi hewan betina dewasa yang memperlihatkan perubahan organ-organ reproduksi tertentu. Organ-organ tersebut adalah organorgan reproduksi, seperti ovarium, oviduk, uterus, dan vagina. Siklus reproduksi pada mamalia (primata) disebut dengan siklus menstruasi, sedangkan siklus reproduksi pada non-primata (tikus) disebut siklus estrus (*Champbell . 2004: 163*). Siklus estrus adalah proses berulang yang menggambarkan perubahan kadar hormon reproduksi yang disebabkan oleh aktivitas ovarium di bawah pengaruh hormon pituitari. Perubahan kadar hormon reproduksi selanjutnya menyebabkan perubahan struktur pada jaringan penyusun saluran reproduksi. Siklus estrus ditandai dengan adanya birahi pada hewan betina, sehingga akan bersifat reseptif terhadap hewan jantan pada saat estrus. Hal tersebut dikarenakan di dalam ovarium terjadi pematangan sel telur dan uterus berada pada fase yang tepat untuk implantasi.

Siklus Estrus

Siklus estrus merupakan suatu siklus reproduksi yang dialami mamalia betina non primata. Estrus berasal dari bahasa latin —oestrus yang berarti —kegilaan atau —gairah dimana pada fase ini merupakan satusatunya waktu dimana terjadi perubahan pada vagina yang memungkinkan terjadinya perkawinan. Pengaruh musim dan iklim juga lebih kuat terhadap siklus estrus.

Estrus kadang-kadang disebut —heat

(panas) karena pada saat tersebut, suhu tubuh betina meningkat.

Panjang dan frekuensi siklus reproduksi pada masing-masing organisme berbeda-beda. Pada tikus, siklus estrus berlangsung selama 5 hari. (Campbell, N. Et al. 2004)

Siklus estrus dibedakan dalam 2 fase, yaitu fase folikular dan fase luteal. Fase folikular adalah pembentukan folikel sampai masak, sedangkan fase luteal adalah fase setelah ovulasi, kemudian terbentuknya korpus luteum dan sampai mulainya siklus. Siklus estrus terdiri dari 4 fase, yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Setiap fase dalam siklus ditentukan berdasarkan bentuk sel epitel pada pengamatan sitologi vagina (*Spornitz et..al. 1999*). Penentuan masa estrus dilakukan melalui pemantauan siklus estrus yang dapat dilakukan dengan pembuatan ulas vagina. Ulas vagina tersebut merupakan cara kualitatif yang dapat memantau siklus estrus melalui sel epitelium skuamosa yang diambil dari vagina hewan (Nadjamudin et.al. 2010).

Pemantauan masa estrus secara kuantitatif dilakukan melalui pengukuran kadar hormon. Kadar hormon dapat diamati melalui beberapa metode. Metode pengukuran kadar hormon yang biasa dilakukan menggunakan *radioimmunoassay* (RIA) dan *enzymeimmunoassay* (EIA). Metode RIA membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya dan menggunakan reagen berlabel radioaktif sehingga memerlukan ekstra kehati-hatian dalam penanganannya. Selain itu, biaya yang dikeluarkan untuk mengolah bahan mengandung radioaktif cukup besar (Sacher & Richard 2002). Metode EIA membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan hasil analisisnya dan jenis reagen yang digunakan bervariasi. Semakin besar jumlah protein yang diukur maka membutuhkan reagen imunokimia yang kompleks pula, sehingga biaya yang dikeluarkan juga besar (Setiawan 2007). Siklus estrus terjadi dalam empat fase, yaitu fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Masing-masing fase pada siklus estrus dapat diamati dengan metode apus vagina. (Isnaeni, Wiwi. 2006) siklus estrus pada mencit, adalah sebagai berikut:

(1). Proestrus

Fase proestrus merupakan fase persiapan dari siklus birahi, setiap jenis hewan betina yang berada dalam fase ini mulai menampilkan gejala birahi walaupun belum mau menerima pejantan untuk kopulasi. Folikel de graaf akan tumbuh di bawah pengaruh hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) (McDonald, L.E. 2001)

Proestrus adalah fase persiapan dan biasanya berlangsung dalam waktu yang relatif pendek. Pada fase ini juga mulai terlihat perubahan pada alat kelamin betina. Pada ovarium terlihat pertumbuhan folikel sampai pada ukuran maksimum. Hal tersebut mengakibatkan sekresi esterogen dalam darah meningkat sehingga akan menimbulkan perubahan-perubahan fisiologis dan syaraf kelakuan birahi pada hewan.

Perubahan fisiologis tersebut meliputi pertumbuhan folikel, peningkatan dan pertumbuhan endometrium, uterus, serviks serta vaskularisasi dan keratinisasi epitel vagina pada beberapa spesies. (*Toelhere, M.R. 1979*)

Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh FSH sehingga folikel tumbuh dengan cepat. Pada saat proestrus, estrogen diproduksi seiring dengan perkembangan folikel di ovarium. Karena aktivitas estrogen menyebabkan proliferasi sel-sel epitel vagina, maka gambaran ulsan vagina pada fase ini ditandai dengan keberadaan sel-sel epitel berinti (*Kusdiantoro dkk, 2005*).

Pada fase ini juga terjadi LH *surge* yang dibutuhkan untuk mengimbas ovulasi. Pada preparat *vaginal smear* ditemukan sel-sel peralihan, yaitu peralihan dari sel-sel parabasal dan sel-sel intermediet menuju sel superficial. Proestrus berlangsung selama 2-3 hari. Pada fase kandungan air pada uterus meningkat dan mengandung banyak pembuluh darah dan kelenjar-kelenjar endometrial mengalami hipertrofi.

(2). Estrus

Fase berikutnya adalah fase estrus yang ditandai oleh keinginan birahi dan penerimaan pejantan oleh hewan betina. (*Toelihere, M.R.1979*)

Estrus merupakan fase yang terpenting dalam siklus estrus, karena dalam fase ini hewan betina menunjukkan perilaku mau menerima hewan jantan untuk melakukan kopulasi. Perubahan yang terjadi pada ovarium yaitu dimulainya pemasakan bagi folikel yang telah dimulai pertumbuhannya pada fase proestrus. Pada fase ini folikel de graaf membesar dan menjadi matang. (*Guyton,A.C.1986*). Dengan demikian folikel pada fase estrus adalah folikel yang telah siap untuk diovulasikan. Pada tikus ovulasi terjadi pada pertengahan fase estrus. Hormon estrogen menyebabkan peningkatan mitosis dan proliferasi selsel epitel dan proses pertandukan pada sel-sel epitel permukaan. Konsentrasi estrogen yang tinggi pada saat estrus mengakibatkan penebalan dinding vagina dan mengakibatkan sel-sel epitel mengalami pertandukan dan terlepas dari dinding epitel vagina. Sel-sel pertandukan terlihat dominan pada hasil ulas vagina (*Kumar et.al, 2005*).

Gambaran preparat *vaginal smear* pada fase ini ditandai dengan ditemukannya banyak sel-sel superfisial. Sel superfisial adalah sel terbesar yang dapat dilihat dalam *vaginal smear*, berbentuk poligonal dan terlihat sangat pipih. Nukleus terkadang tidak ditemukan atau ditemukan tetapi sangat kecil dan gelap (piknotik). Sel-sel superfisial yang tanpa inti tersebut seringkali mengalami kornifikasi. Pada fase ini terkadang juga ditemukan leukosit dalam jumlah yang sangat sedikit. Fase estrus merupakan periode birahi dan kopulasi hanya

dimungkinkan pada saat ini. Keadaan ini pada tikus berakhir 9 sampai 15 jam dan ditandai dengan aktifitas berlari-lari yang sangat tinggi (Turner dan Bagnara, 1988). Pada fase ini hewan-hewan menunjukkan perubahan perilaku. Saat ini betina-betina tersebut menjadi sangat menarik bagi pejantan. Hewan yang sedang berada dalam fase estrus tersebut juga mau menerima rangsangan dari hewan jantan, bahkan kadang-kadang merekah yang mencari pejantan-pejantan tersebut.

(3). Metestrus

Berikutnya adalah fase metestrus. Fase ini merupakan fase lanjutan ketika sistem reproduksi di bawah pengaruh hormon yang diproduksi oleh corpus luteum. Progesteron menghambat sekresi FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) sehingga menghambat pembentukan folikel de graaf dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus uterus mengadakan persiapan-persiapan untuk menerima dan memberi makan embrio. Apabila tidak terjadi fertilisasi, uterus dan saluran reproduksi akan beregresi ke keadaan yang kurang aktif yang sama sebelum proestrus, disebut diestrus (Toelihere, M.R. 1979)

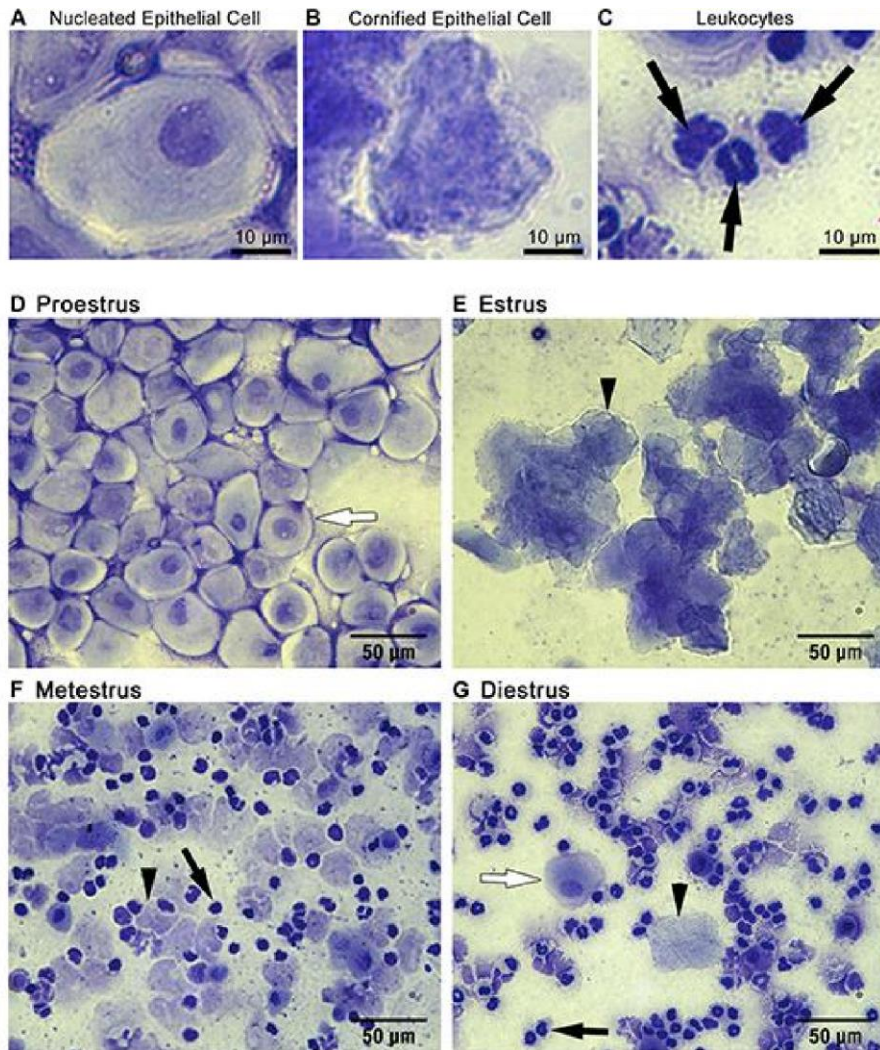
Metestrus adalah fase dalam siklus estrus yang terjadi segera setelah estrus berakhir. Metaestrus ditandai dengan terhentinya birahi, ovulasi terjadi dengan pecahnya folikel, rongga folikel secara berangsur-angsur mengecil, dan pengeluaran lendir terhenti. Selain itu terjadi penurunan pada ukuran dan vaskularitas. Dalam ovarium terjadi pembentukan korpus hemoragikum pada tempat folikel de Graaf yang baru saja melepaskan ovum. Banyak leukosit muncul dalam lumen vagina dengan sedikit sel-sel superficial

(4). Diestrus

Fase terakhir dan terlama dari siklus estrus adalah fase diestrus. Pada tahap ini terbentuk folikel-folikel primer yang belum tumbuh dan beberapa yang mengalami pertumbuhan awal. Fase ini disebut juga dengan fase istirahat karena mencit betina sama sekali tidak tertarik pada mencit jantan. Pada apusan vagina akan terlihat banyak sel sel epitel berinti dan sel leukosit (Toelihere, M.R.1979). Diestrus adalah fase dalam siklus estrus yang ditandai tidak adanya kebuntingan, tidak adanya aktivitas kelamin dan hewan menjadi tenang. Dalam permulaan fase diestrus korpus hemoragikum mengkerut karena di bawah lapisan hemoragik ini tumbuh sel-sel kuning yang disebut luteum. Diestrus adalah fase yang terlama diantara fase-fase lain dalam siklus estrus. Pada fase ini terjadi penurunan jumlah sel-sel superfisial pada preparat *vaginal smear* dan mulai munculnya sel-sel parabasal yaitu sel epitel terkecil yang dapat ditemukan pada *vaginal smear* dengan bentuk bulat atau agak bulat. Sel-sel parabasal mempunyai inti yang besar. Selain itu juga dapat ditemukan adanya sel-sel intermediet yang mempunyai bentuk beragam dan ukurannya biasanya dua sampai tiga kali lebih besar dari sel parabasal.

Diestrus adalah periode terakhir dari estrus, pada fase ini corpus luteum berkembang dengan sempurna dan efek yang dihasilkan dari progesteron (hormon yang dihasilkan dari corpus luteum) tampak dengan jelas pada dinding uterus serta folikel-folikel kecil dengan korpora lutea pada vagina lebih besar dari sebelum ovulasi.

Pada fase estrus, terlihat pengaruh estrogen dan dikarakteristikkan oleh sel kornifikasi yang nyata (jelas) dan hilangnya leukosit. Pada akhir fase estrus, lapisan kornifikasi tampak sloughed off dan invasi leukosit terjadi. Selama diestrus, leukosit tampak berlimpah. Fase proestrus, tanpa leukosit dan dikarakteristikkan oleh sel epitel yang dinukleasi. Fase estrus terjadi dengan pengaruh hormon gonadotropin dan sekresi estrogen mempunyai pengaruh yang besar. Fase metestrus, selama fase ini dimana sinyal stimulasi estrogen turun. Uterus dipengaruhi oleh progesteron dan menjadi sekretori. Tipe fase ini adalah jelas dan mungkin berakhir 1-5 hari (Hill, 2006). Penurunan panjang lama waktu fase proestrus ini diduga karena senyawa alkaloid dan flavonoid yang bersifat antiestrogen yaitu hormon yang dapat menghambat atau mengganggu pertumbuhan folikel dan sekresi hormon estrogen (Sa_roni dan Adjirin, 2001).



Gambar 14:A-C. Sitologi vagina mewakili setiap tahap estrus. Tiga jenis sel iidentifikasi: (A) epitel berinti (B) epitel cornified dan (C) leukosit. Rasio sel untuk menentukan tahap estrus mouse (*hasil yang representatif, gambar: D-G* statusnya langsung hormonal (Ashleigh C. McLean, 2012)

Ketika mencit betina di proestrus, sebagian besar berinti dan beberapa sel epitel cornified yang hadir. Beberapa leukosit mungkin hadir jika perempuan berada dalam proestrus awal. Sebagai tahap siklus maju ke estrus, sebagian besar sel-sel epitel cornified yang hadir. Jika siklus tersebut tidak terganggu oleh kehamilan, pseudopregnancy, atau fenomena lain, metestrus akan dimulai. Metestrus adalah tahap singkat ketika bentuk lutea corpora tetapi gagal untuk sepenuhnya luteinize

karena kurangnya sebuah progesteron. Lapisan rahim akan mulai mengelupas dan bukti ini terlihat dalam bentuk sel eipithelial cornified dan leukosit polimorfonuklear hadir dalam penyeka vagina. Beberapa Sel-sel epitel berinti juga akan hadir pada akhir metestrus. Diestrus adalah terpanjang tahap yang berlangsung lebih dari 2 hari. Penyeka vagina selama diestrus menunjukkan terutama polimorfonuklear leukosit dan sel epitel beberapa pada akhir diestrus. Leukosit tetap jenis sel dominan setelah dihapus puing-puing selular. Siklus ini kemudian mengulang. (*Byers S.L. et al. 2012*)

2.5 Hormon Pengendali Siklus Estrus

Seperti halnya siklus menstruasi yang terjadi pada mamalia betina primata, siklus estrus sangat dipengaruhi oleh hormon estrogen dan progesteron yang dihasilkan ovarium serta hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) dan LH (*Luteinizing Hormone*) yang dihasilkan oleh hipofisis anterior. Hormon FSH merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium dan folikel yang sedang tumbuh ini mensekresikan hormon estrogen, dimana saat terjadinya lonjakan dari hormon estrogen, hipofisis anterior akan meningkatkan sekresi hormon LH sehingga akan terjadi ovulasi. Setelah ovulasi LH akan merangsang jaringan folikel yang tertinggal di ovarium, untuk membentuk korpus luteum yang akan mensekresikan hormon progesteron. Hormon progesteron ini akan merangsang penebalan dinding endometrium untuk mempersiapkan kehamilan jika terjadi pembuahan. (*Ganong, W.F. 1999 dan Campbell, N. Et al. 2004*)

Hormon adalah zat organik yang dihasilkan oleh kelenjar endokrin yang langsung dialirkan ke dalam peredaran darah dan mempengaruhi organ target. Regulasi pada siklus estrus melibatkan interaksi resiprokal antara hormon reproduksi dari hipotalamus, hipofisis anterior, dan ovarium (*Spornitz dkk. 1999: 117*).

Hormon reproduksi yang berasal dari ovarium adalah hormon steroid. Hormon steroid sangat berperan penting dalam pengendalian siklus estrus. Hormon steroid merupakan lipid, turunan dari kolesterol, dan disekresikan oleh gonad, korteks adrenal, dan plasenta. Secara umum, fungsi hormon adalah mempertahankan keseimbangan atau homeostasis tubuh, membantu tubuh bereaksi secara tepat terhadap stres (bekerja sama dengan sistem saraf), mengatur pertumbuhan dan perkembangan tubuh, dan mengontrol perkembangan seksual dan reproduksi. Hormon steroid yang terlibat dalam siklus estrus yang dihasilkan oleh ovarium, yaitu:

2.5.1 Estrogen

Estrogen adalah senyawa steroid yang berfungsi sebagai hormon reproduksi pada betina. Hormon tersebut bertanggung jawab untuk pertumbuhan dan perkembangan vagina, uterus, dan organ penting untuk transportasi ovum, pematangan zigot, dan konsepsi implantasi zigot. Selain itu, hormon tersebut menyebabkan perkembangan dan mempertahankan tanda-tanda kelamin sekunder pada tikus betina, seperti kelenjar mammae, dan juga terlibat dalam penebalan endometrium maupun dalam pengaturan siklus estrus. Estrogen memengaruhi distribusi pengendapan lemak pada tikus betina yang telah

melewati masa pubertas (*postadolescent*). Oleh karena itu, kandungan estrogen jauh lebih tinggi dalam tubuh tikus betina yang berada pada usia subur (Hadley 2000).

Masa subur ditandai dengan dilepaskannya sel telur betina matang melalui peristiwa ovulasi (Sophia, 2003). Pada masa tersebut, hormon estrogen mencapai kadar maksimal dan kemudian menurun drastis. Setelah ovulasi terjadi, rendahnya kadar estrogen akan digantikan dengan mulai meningkatnya kadar progesteron. Peningkatan kadar progesteron menandakan ovulasi telah terjadi dan kadar progesteron akan mencapai puncaknya pada fase midluteal siklus. Fluktuasi kadar hormon- hormon tersebut merupakan respons terhadap bekerjanya hormon-hormon

hipofisis pada organ ovarium (*Champbell et al.*, 2004; Dewi, 2010).

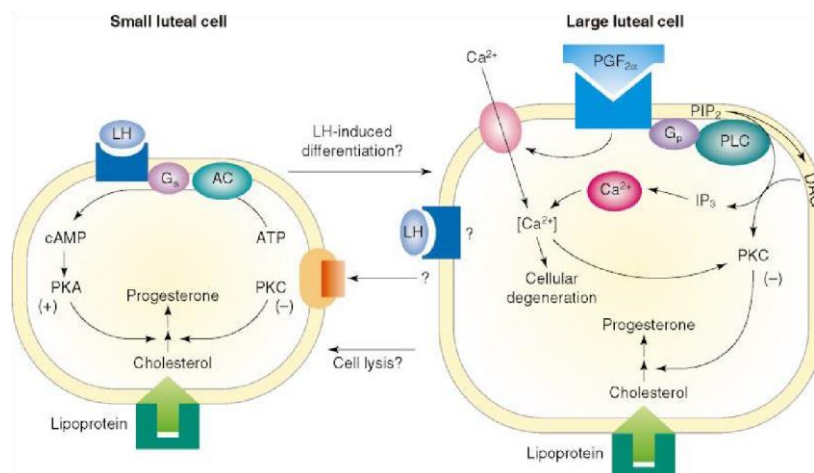
Tiga jenis estrogen utama yang terdapat secara alami dalam tubuh betina adalah estron (E1), estradiol (E2), dan estriol (E3). Ketiga jenis estrogen tersebut dibuat dari androgen dengan bantuan enzim aromatase dalam tubuh. Estradiol dibuat dari testosteron, sedangkan estron dibuat dari androstenedion. Estron tersebut bersifat lebih lemah dari pada estradiol (*Hadley* 2000).

2.5.2 Progesteron

Progesteron adalah hormon steroid yang terlibat dalam siklus estrus dan kehamilan. Progesteron termasuk kelas hormon progestagen. Progesteron diproduksi oleh korpus luteum dalam ovarium setelah

ovulasi dan dalam kelenjar adrenal yang terletak di dekat ginjal, serta di dalam plasenta selama kehamilan (Hadley 2000).

> 85% progesteron yang diproduksi oleh korpus luteum (Niswender et al., 1985). Sekresi progesteron dari besar Sel luteal mungkin bersifat konstituen, sebagai faktor yang akut merangsang sekresi progesteron dari sel-sel ini memiliki efek yang agak sederhana (biasanya kurang dari dua kali lipat) dibandingkan dengan kenaikan 5-15 kali lipat yang tercatat kecil sel luteal. Sebagai pengangkutan kolesterol dari sitosol ke membran mitokondria bagian dalam tampaknya menjadi kuncinya. Proses dalam pengaturan akut sekresi progesteron, nampaknya ada perbedaan dalam pengendalian progesteron. Sekresi dari dua jenis sel luteal melibatkan perbedaan- ences dalam fungsi dari tiga protein yang diketahui terlibat dalam proses ini (Gordon D. Niswender. 2002)



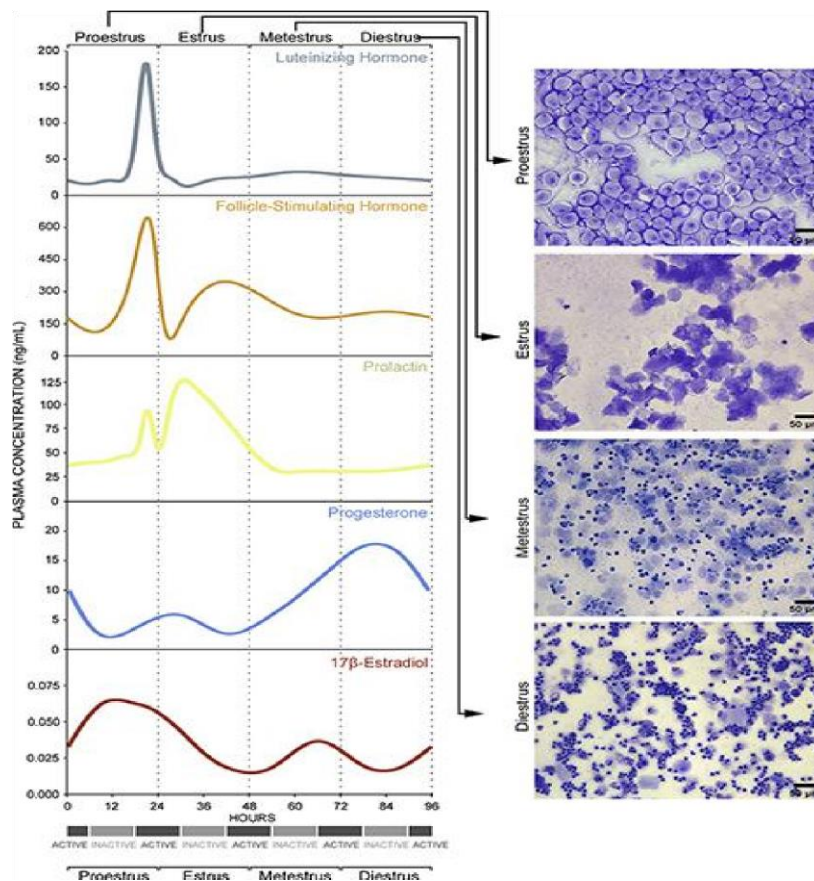
Gambar 15. Model kerja saat ini untuk jalur utusan kedua yang terlibat dalam mengatur sel luteal kecil (kiri) dan besar (kanan). Di sel luteal kecil, pengikatan LH ke reseptornya mengaktifkan jalur pembawa pesan protein kinase A (PKA), yang merangsang sintesis progesteron

Aktivasi farmakologis PKC menghambat sintesis progesteron pada sel luteal kecil, walaupun faktor-faktor yang mengaktifkannya PKC belum dijelaskan. Pada sel besar, LH yang mengikat reseptornya tidak meningkatkan konsentrasi intraseluler cAMP atau peningkatan sintesis progesteron. Pengikatan PGF_2^γ ke reseptornya mengaktifkan PKC, yang merupakan penghambat sintesis progesteron dan menyebabkan masuknya kalsium yang menyebabkan degenerasi seluler. AC: adenilat siklase; DAG: diacylglycerol; Gp: G protein menyebabkan rangsangan fosfolipase C; Gs: G protein yang menyebabkan rangsangan adenilat siklase; IP 3 : inositol 1,4,5-trisphosphate; PIP 2 : phosphatidylinositol 4,5-bisfosfat; PLC: phospholipase C. (Gordon D. Niswender. 2002)

Dengan demikian, ada bukti kuat bahwa setidaknya tiga Protein berperan dalam mengatur pengangkutan kolesterol melintasi membran mitokondria. Fakta bahwa transportasi kolesterol di seluruh membran mitokondria tampaknya terjadi langkah membatasi laju steroidogenesis Progesteron bertanggung jawab mempersiapkan sistem reproduksi untuk implantasi zigot. Hal tersebut menunjukkan bahwa progesteron yang berada pada plasma preovulatori dapat memicu perilaku seksual pada beberapa spesies. Progesteron memiliki peranan dominan dalam mengatur siklus estrus (*Hadley 2000*). Kadar progesteron dalam darah tikus pada awal siklus estrus kurang dari 5 ng/ml, setelah ovulasi kadarnya lebih dari 5 ng/ml (*Cameron & Scarisbrick 1973*).

Progesteron dianggap dapat mewakili teridentifikasi- kasikannya peristiwa ovulasi. Progesteron hanya akan disekresikan melalui suatu badan

yang terbentuk setelah ovulasi terjadi. Setelah ovulasi terjadi, kadar progesteron mulai meningkat, dan terus meningkat sampai mencapai jumlah maksimal (Chambell *et al.*, 2004; Dewi, 2010). Fluktuasi kadar progesteron sepanjang siklus memberi gambaran lengkap profil hormon progesteron. Metode inframerah dapat memberikan profil kadar progesteron sepanjang siklus estrus. Kadar progesteron pada saat nonestrus meningkat empat kali dibandingkan pada masa estrus. (Sjahfirdi L., dkk. 2013)



Gambar 16: Status hormonal sesuai fase siklus estrus (Ashleigh C. McLean, 2012)

2.6 Perbedaan Siklus Estrus dengan Siklus Menstruasi

Dua jenis siklus yang berbeda ditemukan pada mamalia betina. Manusia dan banyak primata lain mempunyai siklus menstruasi (*menstrual cycle*), sementara mamalia lain non primata mempunyai siklus estrus (*estrous cycle*). Saat ovulasi terjadi, setelah endometrium mulai menebal dan teraliri banyak darah karena menyiapkan uterus untuk kemungkinan implantasi embrio, terdapat perbedaan antara kedua siklus. Pada siklus menstruasi, endometrium akan meluruh dari uterus melalui serviks dan vagina dalam pendarahan yang disebut sebagai menstruasi. Sedangkan pada siklus estrus, endometrium diserap kembali oleh uterus dan tidak terjadi pendarahan yang banyak. Perbedaan utama lainnya meliputi perubahan perilaku yang lebih jelas terlihat selama siklus estrus dibandingkan dengan pada siklus menstruasi serta pengaruh musim dan iklim yang lebih kuat pengaruhnya terhadap siklus estrus. Siklus estrus juga merupakan satu-satunya fase yang menyebabkan mamalia betina non primata dapat dikawinkan. (*Campbell, N. et al. 2004*)

Selain hal di atas, terdapat satu perbedaan lagi yaitu siklus estrus berlangsung seumur hidup organisme sementara siklus menstruasi dibatasi oleh fase menopause.

2.7 Organ Reproduksi pada Mencit (*Mus musculus*)

Organ reproduksi pada mamalia betina terdiri atas: ovarium, oviduk, uterus, vagina, alat kelamin luar. Ovarium terdiri atas medula dan

korteks dimana batas antara keduanya sering kali tidak terlihat jelas. Di dalam ovarium terjadi proses pembentukan folikel-folikel hingga berkembang menjadi folikel de Graaf. Kemudian folikel de Graaf akan keluar dari ovarium dan ditangkap oleh fimbriae yang terdapat pada pangkal oviduk. Oviduk atau yang sering disebut tuba falopii merupakan bagian anterior dari saluran reproduksi betina. Uterus merupakan saluran lanjutan dari oviduk. Terdiri dari tiga lapisan, yaitu endometrium (lapisan paling dalam), miometrium (lapisan tengah) dan perimetrium (lapisan terluar). Vagina terdiri dari tiga lapisan juga, yaitu mukosa, muskularis dan fibrosa. Alat kelamin luar terdiri atas vestibulum, labium minor, labium mayor, klitoris serta kelenjar vestibulum. Labium merupakan lipatan kulit yang tersusun oleh jaringan lemak, serabut-serabut elastin dan otot. (Nurhayati, A.P.D.2004)

2.8 Darah

Darah adalah cairan tubuh yang dipompa oleh jantung ke seluruh tubuh, setelah itu di kembalikan kembali ke jantung untuk memberikan zat-zat yang diperlukan, seperti nutrisi dan oksigen ke sel-sel, serta mengangkut sisa metabolisme produk dari sel yang lama (*Rogers, 2011*)

Cairan tubuh tersebut terdiri atas dua bagian, yaitu bagian intraseluler berupa cairan yang disebut dengan plasma dan bagian interseluler terdapat unsur-unsur padat, yaitu sel darah (*Pearce 2002*). Darah dapat diartikan pula sebagai jaringan hidup yang kompleks yang sangat terdiferensiasi, yang mengalir dari jantung melalui arteri ke seluruh

tubuh, berinteraksi dengan sel-sel melalui jaringan kapiler dan kembali ke jantung (*Rhoades & Tanner 1995*).

Karakteristik yang dimiliki darah berupa plasma terdiri atas air, protein, dan mineral, dengan komposisi berturut-turut adalah 91%, 8%, dan 0,9%. Sisanya diisi oleh sejumlah bahan organik yaitu glukosa, lemak, urea, asam urat, kreatin, kolesterol, dan asam amino. Plasma darah juga berisi gas, hormon, enzim dan antigen. Selain plasma, darah terdiri dari sel darah. Sel darah terdiri atas tiga jenis, yaitu eritrosit atau sel darah merah, leukosit atau sel darah putih, dan trombosit atau keping darah (*Pearce 2002: 133*).

Darah memiliki fungsi penting bagi tubuh. Salah satunya alat transportasi, misalnya transportasi hormon saat siklus estrus pada tikus. Dalam kondisi siklus estrus, terjadi mekanisme umpan balik negatif maupun positif. Mekanisme tersebut melibatkan lima macam hormon, yaitu hormon pelepas gonadotropin (GnRH) yang disekresikan oleh hipotalamus, hormon perangsang folikel (FSH) dan hormon luteinisasi (LH) yang dihasilkan pituitari anterior, serta hormon estrogen dan hormon progesteron disekresikan oleh ovarium (*Chambell et al. 2004: 163*). Mekanisme tersebut mempengaruhi kadar hormon pituitari dan hormon ovarium dalam plasma darah pada tikus sepanjang siklus estrus (*Emanuele et al. 2002: 277*).

2.10 Hipotesis

1. Terdapat efek pemberian ekstrak biji pinang dalam mengganggu lama siklus estrus pada balb/c melalui pengaruhnya pada ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron
2. Terdapat efek pemberian ekstrak biji pinang dalam mengganggu lama siklus estrus pada balb/c melalui pengaruhnya pada kadar FSH, LH dan Estradiol.
3. Terdapat Perbedaan lama siklus estrus antara kelompok yang diberikan ekstrak pinang dengan yang tidak diberikan
4. Kejadian gangguan lama siklus estrus lebih banyak pada kelompok yang diberikan ekstrak pinang dari pada kontrol
5. Terdapat perbedaan dinamika ekspresi mRNA gen reseptor progesteron berdasarkan perbedaan dosis
6. Terdapat perbedaan dinamika kadar FSH berdasarkan perbedaan dosis
7. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA gen reseptor LH antara yang diberikan ekstrak pinang dengan yang tidak diberikan ekstrak pinang
8. Terdapat perbedaan ekspresi mRNA gen reseptor FSH antara yang diberikan ekstrak pinang dengan yang tidak diberikan ekstrak pinang

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Disain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimen in vivo pre and post design

3.2 Waktu dan tempat penelitian

Tempat penelitian di bagian Mikrobiologi laboratorium Biologi Moleculer dan Immunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, pengambilan sampel dilaksanakan pada bulan Desember 2016 – April 2017

3.3 Subyek Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalah mencit balb/c. Berat hewan coba 20-40 gram dan umur 8 – 12 minggu. Strain yang dipilih adalah tikus balb/c betina sebab strain ini biasa digunakan untuk penelitian yang berhubungan dengan alat reproduksi (*Byers SL, et al. 2012*). Sebelum digunakan sebagai subyek penelitian, pada hewan coba dilakukan evaluasi klinis dan di kondisikan dalam lingkungan yang sesuai untuk meyakinkan bahwa hewan tersebut tidak berpenyakit atau tidak berpotensi menularkan penyakit. Sebelum mendapatkan perlakuan penelitian, dilakukan seleksi sampel dengan criteria.

Kriteria sampel Penelitian

Kriteria inklusi

Mencit Balb/C betina

Dewasa (umur 8-12 minggu)

Berat badan 20-40 gram

Kondisi sehat fisik

Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

Kriteria eksklusi

Mencit mati atau sakit

Cara Sampling

Sampel dibagi kedalam 3 kelompok (K0,K1,K2), yang terdiri dari lima hewan coba untuk setiap kelompok perlakuan. Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*).

Besar Sampel

Besar sampel ditentukan menurut WHO, yaitu minimal 5 ekor untuk setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 15 ekor mencit Balb/c yang dibagi ke dalam 3 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 mencit Balb/c. Jumlah Strain tikus balb/c betina yang digunakan di hitung dengan perhitungan besar sampel (rumus Federer, 1963)

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

$$(3-1) (n-1) \geq 15$$

$$2n-1 \geq 15$$

$$2n \geq 16 \quad n \geq 8/\text{kelompok} + 10\% = 9/\text{kelompok}$$

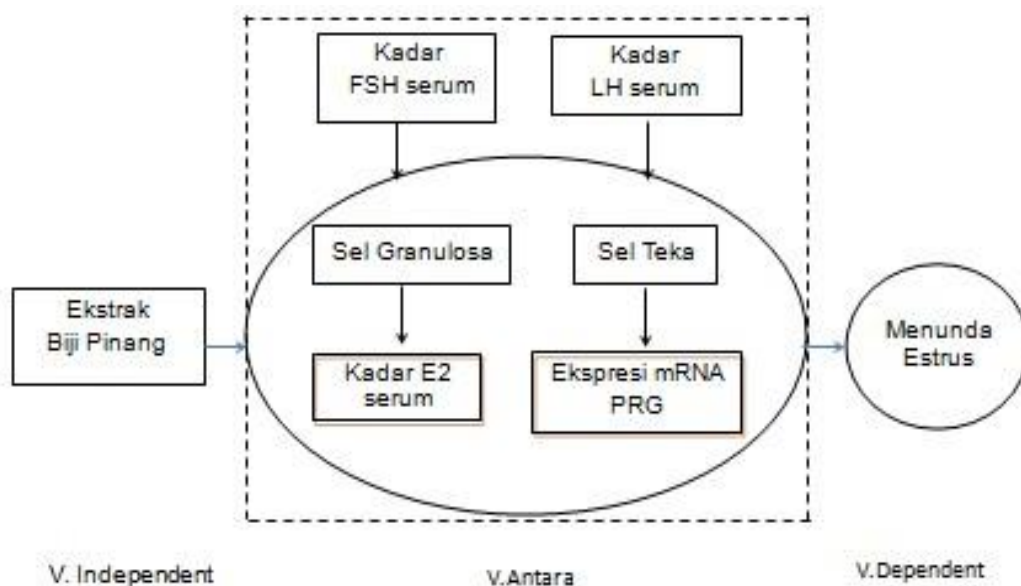
t = jumlah kelompok (pada penelitian ini t = 3)

n= jumlah sampel perkelompok

Perhitungan jumlah sampel dengan kemungkinan hewan dikeluarkan dari penelitian karena sakit/mati ditambah sebesar 10%. sehingga jumlah Mencit strain balb/c tiap kelompok adalah 9 ekor dengan total sampel 27 ekor, untuk 3 kelompok.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratories *in vivo*, dengan rancangan *randomized post test only control group design*; untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji buah pinang selama 7 hari pada unit eksperimen dengan mengukur variable dilakukan setiap hari selama satu kali siklus estrus.

3.4 Kerangka Konsep



Gambar 18 : Kerangka Konsep

Keterangan:

V. independen : Pinang/alkaloid

V. antara : Kadar FSH, LH, E2, Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron

V. dependen : siklus estrus

Variabel Penelitian

Variabel bebas

Dalam penelitian eksperimen, variable bebas adalah perlakuan, pada penelitian ini adalah ekstrak biji buah pinang dengan dosis yang digunakan adalah; Kelompok 1 (kontrol) mendapat aquades, Kelompok 2 mendapat ekstrak biji pinang 1 g/200 gr BB mencit betina, Kelompok 3 mendapat ekstrak biji pinang 2 1 g/200 gr BB mencit betina, Penentuan dosis ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Akmal M, et al. 20010 dimana terjadi peningkatan konsentrasi testosteron didalam darah setelah pemberian ekstrak biji pinang pada dosis 1 dan 2 gram/200 gram BB tikus selama satu minggu.

Variabel antara

Variable antara dalam penelitian ini adalah respon obyek penelitian terhadap perlakuan, yang berlaku sebagai penghubung antara variable bebas dengan variable tergantung, dalam hal ini adalah hasil pemeriksaan kadar FSH, LH, Estradiol dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron

Variabel Tergantung

Variable tergantung dalam penelitian eksperimen merupakan respon obyek penelitian terhadap perlakuan yang diberikan. Pada penelitian ini yang dimaksud dengan variable tergantung adalah siklus estrus mencit.

Variabel kendali

Variable kendali adalah variable yang dikendalikan oleh peneliti agar subyek penelitian dalam keadaan homogen. Pengendalian dilakukan dengan memberlakukan syarat sampel yang digunakan pada penelitian ini. Variable kendali pada penelitian ini adalah jenis kelamin betina, berat badan mencit, kondisi fisik mencit sehat dan tidak ada kelainan anatomi mencit, kandung mencit, makanan mencit, tidak dalam kondisi hamil, cara pemeliharaan, cara pemberian dan dosis ekstrak biji pinang.

3.6 Definisi Operasional

- Pinang adalah Buah tumbuhan ini juga dinamai sama dengan tanamannya. Komponen utama biji pinang adalah karbohidrat, lemak, serat, polifenol yang meliputi flavonoid dan tanin, alkaloid dan mineral, kandungan alkaloid dalam biji sebesar 0,3-0,7% yang bekerja kolinergik, seperti arecolin ($C_8H_{13}NO_2$), terdapat empat alkaloid utama di dalam biji pinang, yaitu *arecoline* (7,5 mg/g), *arecaidine* (1,5 mg/g), *guvacoline* (2,0 mg/g), dan *guvacine* (2,9 mg/g).
- Folikel Stimulating Hormon (FSH) adalah hormone glikoprotein yang berperan pada siklus reproduksi, stimulus folikel ovarium dan proses pematangan ovarium pada ternak betina.
- luteinizing hormone (LH) adalah pembentukan korpus luteum penghasil hormon di ovarium setelah ovulasi serta mengatur hormon estrogen dan progesteron Estradiol adalah estrogen utama yang dihasilkan oleh indung telur
- Estrogen adalah senyawa steroid yang berfungsi sebagai hormon reproduksi pada betina

- Ekspresi messenger RNA (mRNA) gen reseptor progesteron adalah hasil proses transkripsi dari progesteron yang berperan pada sintesis protein.
- Siklus estrus merupakan suatu siklus reproduksi yang dialami mamalia betina non primate. Pada siklus ini terjadi empat fase, yaitu fase diestrus, proestrus, estrus dan metestrus. Siklus estrus berlangsung selama 5 hari.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

Hewan coba yang diberi perlakuan adalah mencit berina sterin balb/c yang memenuhi criteria inklusi dan eksklusi akan mendapatkan pembagian kelompok sesuai dengan randomisasi. Alat dan bahan untuk pemeriksaan laboratorium antara lain:

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Mencit Balb/c (8 – 12 mg)
2. Ekstrak biji pinang
3. Pakan dan minum standar mencit
4. Aquadest

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

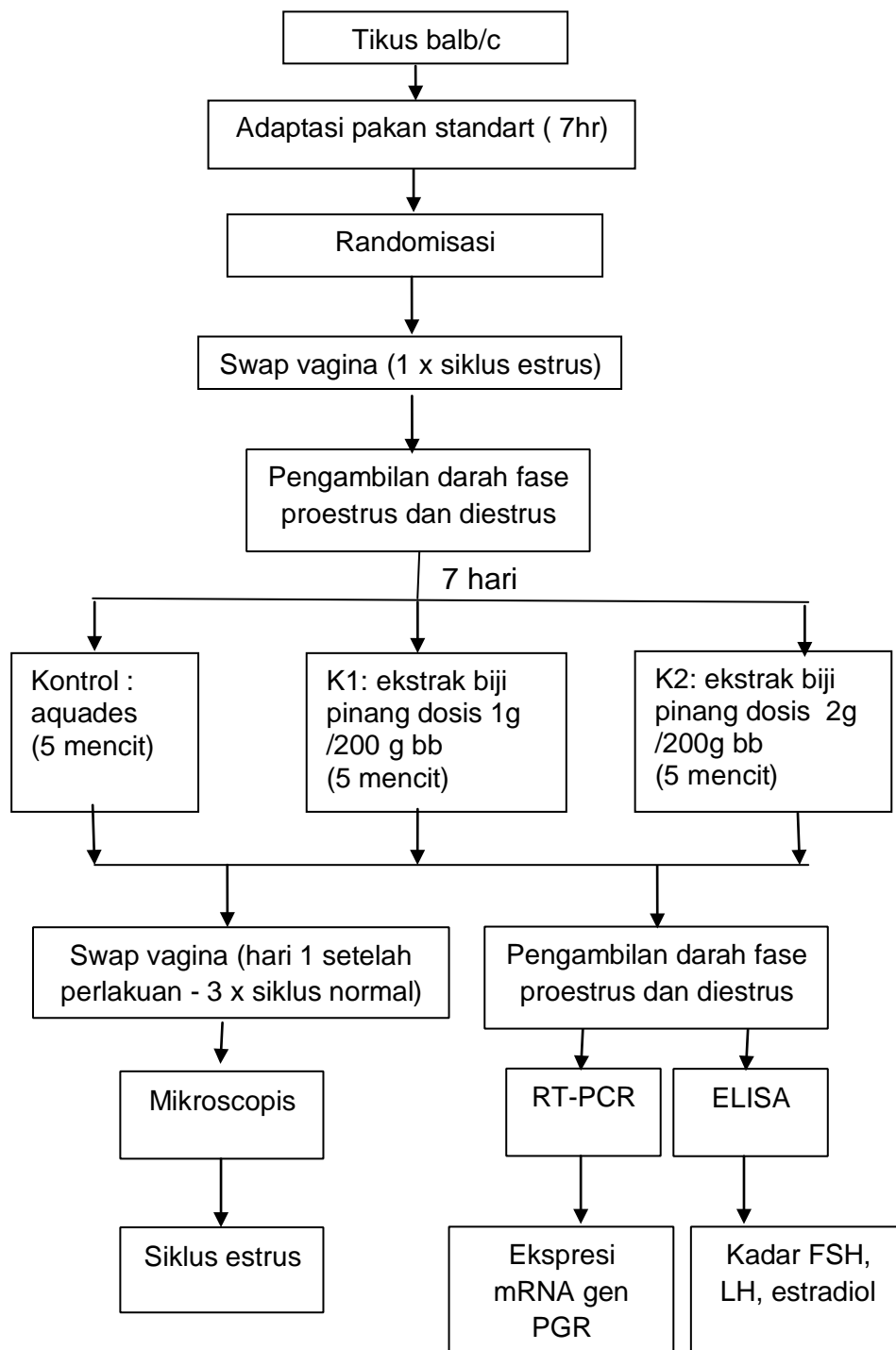
1. Alat pemeliharaan tikus
2. Kandang
3. Botol berpipet
4. Tempat makanan
5. Perlakuan terhadap tikus
6. Sonde lambung

7. Sduit
8. Timbangan
9. Pengambilan sampel
10. Tabung mikro hematom
11. Tabung sampel
12. Sduit 1 ml
13. Sarung tangan

3.8 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer yang di dapat dari hasil RT-PCR dan histologi sel vagina

3.9 Alur Penelitian



Gambar 19 : Alur Penelitian

Keterangan:

Kelompok Kontrol : Kelompok mencit Balb/c yang diberi aquades

Kelompok P1

: Kelompok mencit Balb/c yang diberi ekstrak biji pinang dosis 1g /200g BB

Kelompok P2

: Kelompok mencit Balb/c yang diberi ekstrak biji pinang dosis 2g /200g BB

3.10 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini meliputi beberapa langkah:

Persiapan alat dan bahan (seperti di atas)

Pembuatan ekstrak biji pinang

Cara pembuatan ekstrak biji pinang

Biji pinang yang digunakan adalah yang kulitnya sudah berwarna kuning. Pemilihan pinang jenis ini berdasarkan penelitian Susila (2003). Selain itu, pada jenis pinang tersebut diketahui mempunyai kandungan *arecoline* yang relatif lebih rendah dibandingkan biji pinang muda. Biji pinang yang dipilih harus dalam keadaan baik (tidak busuk) atau pun berjamur.

Caranya adalah sebagai berikut: pinang dikupas, lalu diambil bijinya dan dihaluskan dengan martil, kemudian dijemur sampai kering. Biji pinang yang sudah kering ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambahkan aquades sebanyak 200 ml. Selanjutnya dipanaskan hingga tersisa 100 ml ekstrak biji pinang, sehingga setiap 1 ml mengandung 2 gram ekstrak biji pinang (Aulanni'am *et al.*, 2007). Penentuan dosis ekstrak biji pinang sesuai hasil penelitian Akmal M., et al. 2010 dimana telah terjadi peningkatan konsentrasi testosteron didalam darah setelah pemberian ekstrak biji pinang pada dosis 1 dan 2 gram/200 gram BB tikus selama satu minggu.

3.11 Perlakuan pada hewan coba

Lima belas ekor mencit Balb/c diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar. Mencit dikandangkan secara memadai pada suhu lingkungan normal dengan siklus 12 jam siang dan 12 jam malam dan diberikan pakan serta minum secara *ad libitum* (*air diasamkan*).

Sampel kemudian dilakukan pengelompokan secara acak sehari setelah masa adaptasi selesai dengan cara: mencit dibagi dalam 3 kelompok secara acak, yaitu kelompok Kontrol (K0), kelompok perlakuan 1 (K1), kelompok perlakuan 2 (K2) masing-masing kelompok 5 ekor mencit dan selanjutnya di beri pengkodean.

Dilakukan swap vagina (15 ekor) swap vagina untuk menentukan lama siklus estrus sebelum perlakuan (pre)

Dilakukan pengambilan darah pada siklus estrus berada pada fase proestrus (kadar FSH, LH, estradiol) dan pada fase diestrus (ekspresi mRNA gen reseptor progesteron)

Masing-masing kelompok diberi perlakuan selama 7 hari setelah masa adaptasi selesai dengan:

Kelompok Kontrol (K0)

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan plasebo berupa aquadest melalui sonde.

Kelompok perlakuan 1 (K1)

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan ekstrak biji pinang dengan dosis 1mg/ 200g bb melalui sonde.

Kelompok perlakuan 2 (K2)

Setelah pengelompokan selesai, mencit diberikan ekstrak ekstrak biji pinang dengan dosis 2 mg/ 200g bb melalui sonde.

Selama perlakuan, semua mencit diberikan pakan dan minum standar *ad libitum*.

Pemberian ekstrak biji pinang dilakukan dengan cara mencekokkan langsung ke lambung menggunakan spuit 5 ml yang sudah dimodifikasi selama 7 hari.

Cara pemberian ekstrak pinang:



Gambar 20 : Cara pemberian ekstrak pinang peroral pada hewan coba

Pada hari 1 setelah perlakuan, di lakukan swap vagina (post) dan pengambilan sampel darahnya dari ekor pada saat fase proestrus dan diestrus. Sampel darah dimasukkan ke dalam botol berpenutup dan selanjutnya di beri pengkodean dan di lakukan ulas vagina.

3.12 Cara pengumpulan Data

Metode Ulas vagina (sitologi vagina)

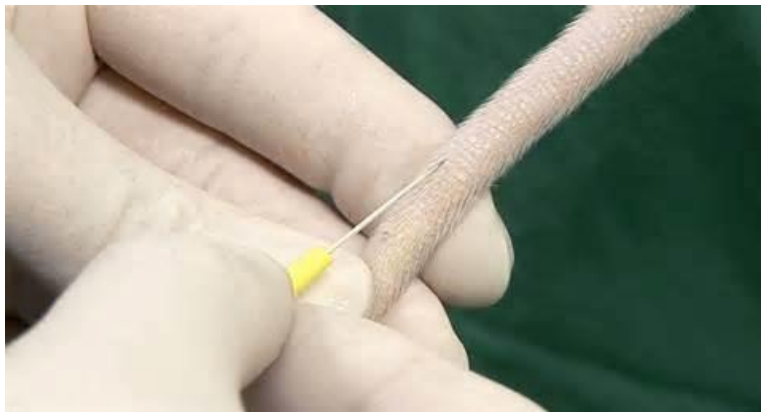
Swab vagina dikumpulkan dengan menggunakan pipet yang diisi dengan air garam fisiologis 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam vagina dan di sedot kembali (2-3 x) dari mencit. Cairan vagina di dipindahkan ke slide kaca kering dengan

cara meneteskan dan di buat 2 biakan dalam satu slide. Slide dikeringkan dengan api bunsen dan udara, kemudian diwarnai dengan cairan giemsa dalam waktu 45 detik. Slide dibilas dengan cairan fisiologis, dilapis dengan coverslip, dan dilihat langsung di pembesaran 400 dbawah pencahayaan lapangan cerah. Tahap dari siklus estrus adalah ditentukan berdasarkan ada atau tidak adanya leukosit, epitel cornified, dan sel epitel berinti menurut

Felicio, et al (*Byers S.L 2012*)

Cara pengambilan darah

Pengambilan darah pada vena bagian ekor sebanyak 0.1 ml menggunakan *syringe* mikrohemaktokrit.



Gambar 21 : Cara pengambilan darah pada vena bagian ekor.

Waktu pengambilan serum darah *balb/c* dilakukan pada saat siklus estrus berada pada saat fase proestrus (kadara FSH, LH, estradiol) dan pada saat diestrus (ekspresi mRNA gen reseptor progesteron), ulas vagina dilakukan setiap hari selama 3 x siklus normal (15 hari) hari di mulai dari hari 1 (pertama) setelah perlakuan intervensi ekstrak pinang. Darah dikumpulkan dan disentrifus untuk mendapatkan serum. Serum disimpan pada tabung steril dan ditaruh lemari pendingin suhu -20°C

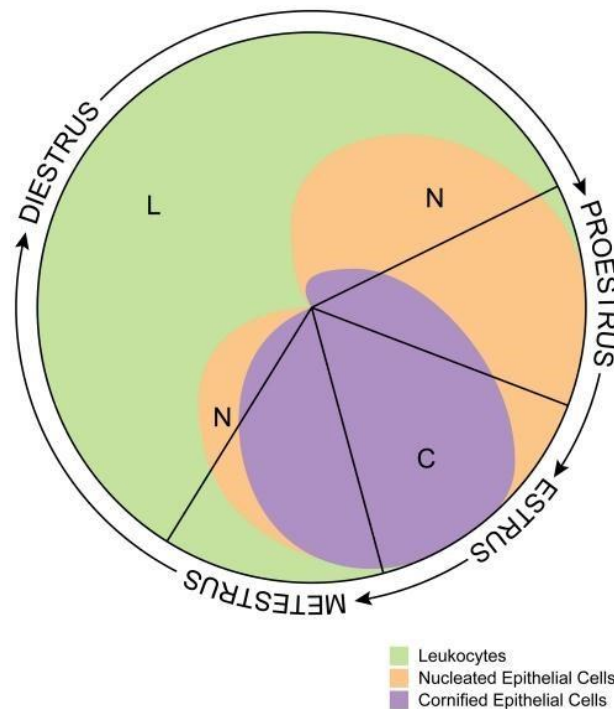
3.13 Penentuan Siklus Estrus

Identifikasi semua tahap siklus estrus (proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus), sitologi vagina dianggap sebagai metode yang paling akurat. (Byers S.L. et al. 2012). Penentuan siklus estrus dengan melakukan ulasan vagina (Henry L.A., Witt D.M. 2002). Ulasan vagina dari seluruh kelompok dilaksanakan selama 5 hari, dimulai pada saat pencekakan telah berjalan 7 hari. Pemeriksaan ulasan vagina dilakukan guna memeriksa gambaran sel epitel pada vagina tikus sehingga dapat menentukan fase estrus dan menghitung panjang siklus estrus. Sediaan ulas vagina yang telah diwarnai ditentukan fase siklus estrusnya melalui identifikasi morfologi sel epitel. Sel epitel yang diamati adalah bentuk sel parabasal, sel intermediet, dan sel superfisial serta keberadaan leukosit yang berbeda-beda pada setiap fasenya. Penentuan awal siklus estrus adalah pada saat sediaan memperlihatkan sel superfisial yang mendominasi lapangan pandang, yang berarti hewan berada pada kondisi estrus (Ward et al., 2005; Westwood, 2008). Perhitungan panjang lama waktu siklus estrus dengan cara mengamati berapa lama waktu siklus estrus mencit setelah pemberian perlakuan dikurangi dengan lama waktu siklus estrus sebelum pemberian perlakuan (Busman H. 2013).

Tabel 1: Karakteristik Fase (Tahapan) Siklus Estrus pada Apusan Vagina mencit

Tahapan Siklus (Lama Tahapan)	Apusan Vagina	Ovarium	Uterus
Diestrus (2 – 2, 5 hari)	E, L, Lendir	Folikel muda	Tipis (kecil halus)
Proestrus (12 jam)	E atau E, C	Folikel tumbuh	Menebal (agak besar)
Estrus awal (12 jam)	E, C++ atau C+++	Ovulasi	Glanduran (bengkak)
Estrus akhir (6 jam)	C+++ Cheesy, kering	Ovulasi	Glanduran (bengkak)
Metestrus (6 jam)	C, L atau E, C, L	Korpus luteum	Akan luruh

Keterangan : E = Epitel berinti
 C = Sel epitel menandung
 L = Leukosit



Gambar 22 : Alat identifikasi untuk membantu menentukan tahap estrus ketika menggunakan sitologi vagina berdasarkan jenis dan proporsi sel dismeaar (Byers S.L.etal. 2012)

Alat representasi visual dari jenis sel dan proporsi relatif dari masing-masing jenis hadir selama empat tahap dari siklus estrus . Garis-garis di tanda lingkaran di mana tahap perubahan estrus . Ukuran masing-masing kuadran (antara 2 baris) adalah perkiraan kasar dari panjang setiap tahap . Total siklus membutuhkan waktu sekitar 4-5 hari . Untuk menggunakan grafik ini , sel-sel vagina diperiksa dan jumlah relatif dari setiap jenis sel ditentukan . Kemudian panah imajiner ditempatkan pada grafik dengan ujung di tengah grafik seperti tangan di jam . Panah dipindahkan searah jarum jam sampai jenis sel dan proporsi muncul di bawah panah . Setelah panah ditempatkan , menunjuk ke tahap yang sesuai dari estrus . Sebagai contoh , sebuah panah di posisi jam 9 merupakan smear vagina dengan semua leukosit dan mouse di diestrus . Panah pada pukul 3 merupakan smear dengan sel epitel epitel setengah berinti sekitar setengah cornified dan mouse di proestrus . (Byers S.L.etal. 2012)

Ketika mencit betina di fase proestrus, sebagian besar sel berinti dan beberapa sel epitel cornified yang hadir. Beberapa leukosit mungkin hadir jika mencit betina berada dalam proestrus awal. Selanjutnya siklus maju ke estrus, sebagian besar sel-sel epitel cornified yang hadir. Jika siklus tersebut tidak terganggu oleh kehamilan, pseudopregnancy, atau fenomena lain, metestrus akan dimulai. Metestrus adalah tahap singkat ketika bentuk lutea corpora. Lapisan rahim akan mulai mengelupas dan bukti ini terlihat dalam bentuk sel epitelial cornified dan leukosit polimorfonuklear hadir dalam penyeka vagina. Beberapa Sel-sel epitel berinti juga akan hadir pada akhir metestrus. Diestrus adalah terpanjang tahap yang berlangsung lebih dari 2 hari. Penyeka vagina selama diestrus menunjukkan terutama polimorfonuklear leukosit dan sel epitel beberapa pada akhir diestrus. Leukosit tetap jenis sel dominan setelah dihapus puing-puing selular. (Byers S.L.etal. 2012)

3.14 Penentuan Ekspresi mRNA gen FSH dan LH

Penentuan Ekspresi mRNA gen FSH dan LH dapat dilakukan dengan menggunakan *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Cara Kerja Realtime PCR mendeteksi mRNA LH dan mRNA FSH

Ekspresi messenger RNA kuantitatif measuredusing kuantitatif RT- PCR (qPCR) dengan sistem CFX Real-Time qPCR (Biorad , USA) . dan SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio) . The primersused untuk QRT - PCR dan mRNAwas β - aktin digunakan sebagai kontrol normalisasi untuk LH dan FSH mRNAs. PCR dilakukan dalam tiga ulangan siklus termal. Kondisi sebagai berikut : 95 ° C selama 10 menit , diikuti oleh 40 cyclesof 95 ° C selama 10 s , 60 ° C

selama 30 s dan 1 siklus 95 ° C selama 1 menit , 55 ° C selama 30 s dan 95 ° C untuk 30 s . (Miyano Y1, et al. 2014)

Primer yang dipakai:

PR FWD: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3'

(26mer) REV: 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG-

3'(26mer) β -actin FWD: 5'-GGTGGGCCTTCCTAACGAG-

3'(19mer)

REV: 5'-GACCACATCAGGCTCAATGCT-3'(21mer)

(Miyano Y1, et al. 2014)

3.15 Analisis Statistik

Data yang didapat diuji normalitasnya dengan uji Kolmogorv-Smirnov dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa semua data terdistribusi normal dan homogen. Data kemudian diuji dengan menggunakan analisis parametrik, yaitu uji T secara berpasangan (Pair T – Test). Untuk melihat dinamika ekspresi mRNA gen reseptor progesteron, kadar FSH, LH dan estradiol dilakukan uji Anova, korelasi antara ekspresi mRNA gen reseptor progesteron, kadar FSH, LH, estradiol dan siklus estrus dilakukan uji korelasi Spearman (Munawar, 1995)

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek biji pinang (*arecacatechu L.*) pada kadar estradiol, FSH, LH, ekspresi mRNA gen reseptor progesteron dan siklus estrus pada mencit balb/c betina dewasa sehat. Penelitian telah dilaksanakan mulai dari tahap November 2016 sampai dengan April 2017.

Jumlah sampel darah di peroleh dari 3 kelompok (K0=kontrol, K1=1gr /200grBB, K2=2gr/200grBB) dimana masing-masing kelompok di lakukan pengambilan darah sebanyak 2-4 kali (K0 dan K2= masing-masing 2 kali/post, K1=4 kali/pre-post) sehingga total berjumlah 20 sampel. Pengambilan darah dilakukan pada saat fase Proestrus dan fase diestrus, untuk mengetahui siklus estrus dilakukan pemeriksaan swap vagina setiap pagi pukul 09.00 wit – 10.00 wit sebelum perlakuan (7 hari) dan sesudah perlakuan (12-15 hari). Jumlah sampel sel vagina dari 3 kelompok sebanyak 319 sampel. Metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: untuk pemeriksaan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron menggunakan RT-PCR, untuk pemeriksaan kadar estradiol, FSH, LH menggunakan Elisa Kit, sedangkan untuk mengetahui siklus estrus di lakukan swap vagina. Rangkuman hasil analisis statistiknya ditampilkan dengan sistematika sebagaiberikut:

Tabel 1: Hasil pemeriksaan hormon dan siklus estrus

Deskripsi variabel

Tabel 1. Hasil analisis deskriptif Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K1 (sebelum perlakuan) dan K0, K1, K2 (setelah perlakuan)

Variabel	Kelompok	Mean		SD
		Sebelum	Sesudah	
Kadar estradiol	K0 (n=5)		626.691	31.833
	K1(n=5)	626.855	329.422	46.469
	K2(n=5)		118.475	49.764
Kadar FSH	K0 (n=5)		50.259	2.705
	K1(n=5)	50.104	26.238	3.748
	K2(n=5)		9.511	3.927
Kadar LH	K0 (n=5)		17.015	0.960
	K1(n=5)	16.935	8.756	1.310
	K2(n=5)		2.992	1.353
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5)		13.592	0.443
	K1(n=5)	13.574	9.131	0.661
	K2(n=5)		6.152	0.580

K0=Aquades; K1=1gr/200grBB;K2=2gr/200grBB

Tabel 2. Hasil analisis deskriptif status estrus sesuai Mean (SD) kadar estradiol, kadar FSH, kadar LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada K0, K1, K2 (setelah perlakuan)

Variabel	Kelompok	Status estrus	Mean	SD
Kadar estradiol	K0 (n=5)	Normal	626.690	31.833
	K1(n=5)	Memanjang	329.422	121.318
	K2(n=5)	Tidak estrus	118.475	133.364
Kadar FSH	K0 (n=5)	Normal	50.259	2.705
	K1(n=5)	Memanjang	26.238	9.614
	K2(n=5)	Tidak estrus	9.511	10.589
Kadar LH	K0 (n=5)	Normal	17.015	0.960
	K1(n=5)	Memanjang	8.756	3.335
	K2(n=5)	Tidak estrus	2.992	3.591
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5)	Normal	13.592	0.443
	K1(n=5)	Memanjang	9.131	1.568
	K2(n=5)	Tidak estrus	6.152	2.028

Tabel 3 : Hubungan kelompok Kontrol dengan Kelompok 1 post

Variabel	Kelompok	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K0 (n=5)	626.690	31.833	.000
	K1 (n=5)	329.422	46.469	.000
Kadar FSH	K0 (n=5)	50.259	2.705	.000
	K1 (n=5)	26.238	9.614	.000
Kadar LH	K0 (n=5)	17.0153	0.960	.000
	K1 (n=5)	8.756	3.335	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5)	13.592	0.443	.000
	K1 (n=5)	9.131	0.661	.000

Analisa

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa pada kelompok 1 (1gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 1,90 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 1,92 kali dan penurunan kadar LH 1, 94, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 1,48 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (aquades).

Tabel 4. Hubungan kelompok kontrol dengan kelompok 2 post

Variabel	Kelompok	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K0 (n=5)	626.690	31.833	.000
	K2 (n=5)	118.475	49.764	.000
Kadar FSH	K0 (n=5)	50.259	2.705	.000
	K2 (n=5)	9.511	3.748	.000
Kadar LH	K0 (n=5)	17.015	0.960	.000
	K2 (n=5)	2.992	1.353	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5)	13.592	0.443	.000
	K2 (n=5)	6.152	0.580	.000

Analisa

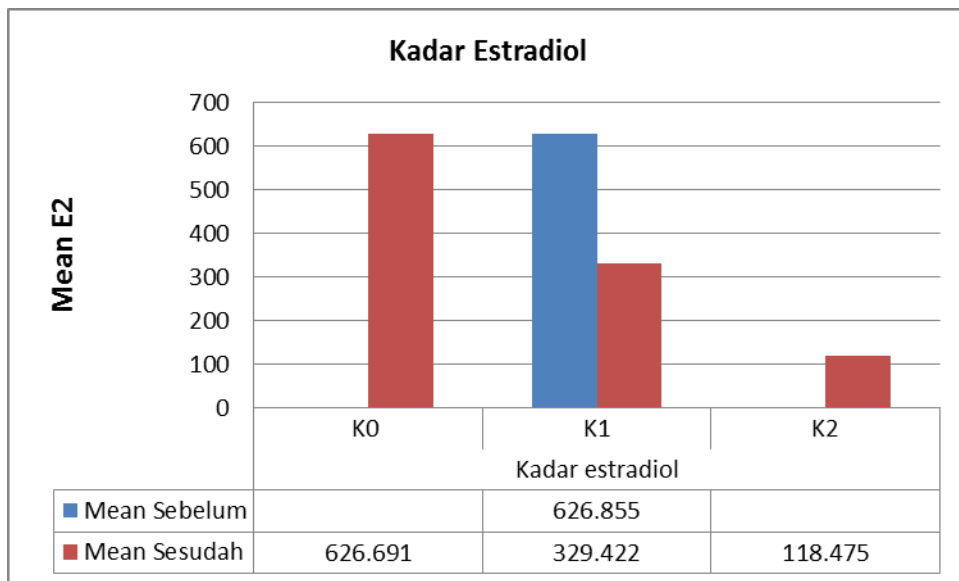
Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa pada kelompok 2 (2 gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 5,28 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 5,28 kali dan penurunan kadar LH 5,68 kali, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 2,20 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (aquades).

Tabel 5 Hubungan kelompok 1 post dengan kelompok 2 post

Variabel	Kelompok	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K1 (n=5)	329.422	46.469	.000
	K2 (n=5)	118.475	49.764	.000
Kadar FSH	K1 (n=5)	26.238	3.748	.000
	K2 (n=5)	9.511	3.748	.000
Kadar LH	K1 (n=5)	8.756	1.310	.000
	K2 (n=5)	2.992	1.353	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K1 (n=5)	9.131	.66147	.000
	K2 (n=5)	6.152	0.580	.000

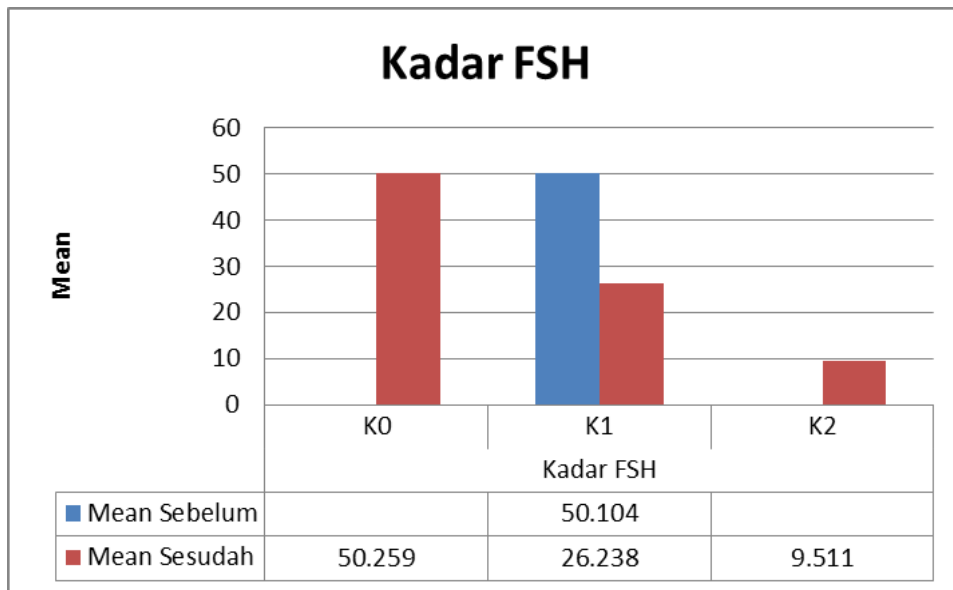
Analisa

Dari tabel di atas dapat di ketahui bahwa pada kelompok 2 (2 gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 2,78 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 2, 75 kali dan penurunan kadar LH 2,92 kali, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 1,48 kali dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (K1).



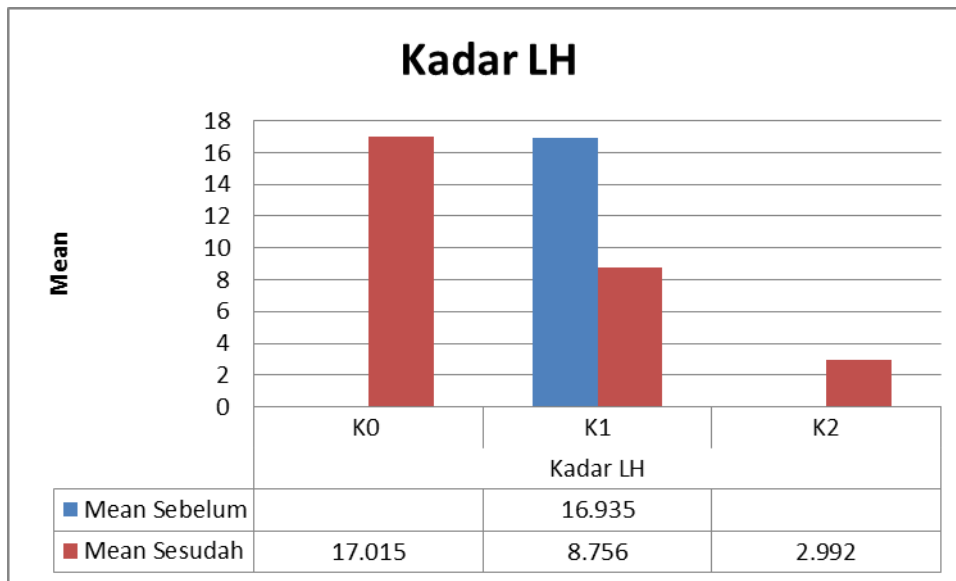
Gambar 23. Kadar estradiol serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang

Dari gambar 23 dapat dilihat bahwa setelah pemberian ekstrak biji pinang selama 7 hari terjadi penurunan kadar estradiol pada kelompok perlakuan 1 (K1) dan kelompok perlakuan 2 (K2) dan sedangkan pada kelompok kontrol (K0) sama dengan kelompok perlakuan 1 (K1) sebelum diberikan perlakuan



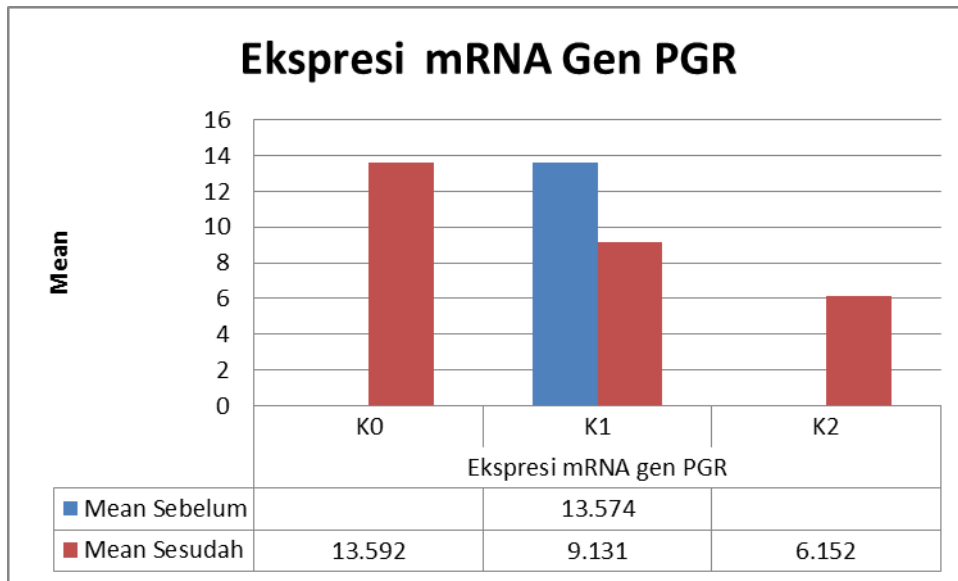
Gambar 24. Kadar FSH serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang

Dari gambar 24 di atas dapat dilihat bahwa setelah pemberian ekstrak biji pinang selama 7 hari terjadi penurunan kadar FSH pada kelompok perlakuan 1 (K1) dan kelompok perlakuan 2 (K2) dan sedangkan pada kelompok kontrol (K0) sama dengan kelompok perlakuan 1 (K1) sebelum diberikan perlakuan



Gambar 25. Kadar LH serum sesudah pemberian ekstrak biji pinang

Dari gambar 25 di atas dapat dilihat bahwa setelah pemberian ekstrak biji pinang selama 7 hari terjadi penurunan kadar LH pada kelompok perlakuan 1 (K1) dan kelompok perlakuan 2 (K2) dan sedangkan pada kelompok kontrol (K0) sama dengan kelompok perlakuan 1 (K1) sebelum diberikan perlakuan



Gambar 26. Ekspresi mRNA gen reseptor progesteron sesudah pemberian ekstrak biji pinang

Dari gambar 26 di atas dapat dilihat bahwa setelah pemberian ekstrak biji pinang selama 7 hari terjadi penurunan Ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada kelompok perlakuan 1 (K1) dan kelompok perlakuan 2 (K2) dan sedangkan pada kelompok kontrol (K0) sama dengan kelompok perlakuan 1 (K1) sebelum diberikan perlakuan.

Tabel 6: pengaruh perlakuan terhadap hormon

Variabel		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Progesteron	Between Groups	140.231	2	70.116	216.769	.000
	Within Groups	3.881	12	.323		
	Total	144.113	14			
E2pgpermL	Between Groups	651916.914	2	325958.457	173.103	.000
	Within Groups	22596.430	12	1883.036		
	Total	674513.344	14			
FSHngpermL	Between Groups	4195.335	2	2097.668	171.046	.000
	Within Groups	147.165	12	12.264		
	Total	4342.500	14			
LhngpermL	Between Groups	496.829	2	248.414	166.813	.000
	Within Groups	17.870	12	1.489		
	Total	514.699	14			

Analisa

Dari tabel di atas dapat di ketahui bahwa terjadi perubahan ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron serum dan penurunan kadar Estradiol, FSH, LH secara signifikan (masing-masing $P= 0.000$) setelah pemberian ekstrak biji pinang dosis 1gr/200gr BB mencit dan dosis 2gr/200gr BB mencit selama 7 hari di bandingkan kelompok kontrol (K0).

Tabel 7 : Hubungan siklus estrus kelompok kontrol (Normal) dengan kelompok perlakuan 1 (memanjang)

Variabel	kelompok	Status estrus	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K0 (n=5) K1 (n=5)	Normal	626.690	31.833	.000
		Memanjang	239.863	121.318	.000
Kadar FSH	K0 (n=5) K1 (n=5)	Normal	50.259	2.705	.000
		Memanjang	19.159	9.614	.000
Kadar LH	K0 (n=5) K1 (n=5)	Normal	17.015	0.960	.000
		Memanjang	6.324	3.335	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5) K1 (n=5)	Normal	13.592	0.443	.000
		Memanjang	7.957	1.568	.000

Analisa

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa ada perbedaan dinamika penurunan hormon setelah perlakuan antara kelompok K0 dengan K1 yang berefek pada siklus estrus. Pada kelompok 1 (1 gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 2,61 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 2, 62 kali dan penurunan kadar LH 2,69 kali, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 1,70 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (K0). Siklus estrus kelompok perlakuan 1 (K1) memanjang dan siklus estrus kelompok kontrol (K0) Normal (4-5 hari) yang artinya ada hubungan secara signifikan (masing-masing P= 0.000) antara hormon

dengan siklus estrus setelah pemberian ekstrak biji pinang dosis 1gr/200gr BB mencit (K1) selama 7 hari dengan kelompok kontrol (aquades) .

Tabel 8 : hubungan siklus estrus kelompok kontrol (normal) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)

Variabel	Kelompok	Status Estrus	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K0 (n=5)	Normal	626.690	31.833	.000
	K2 (n=5)	Tidak estrus	186.815	133.364	.000
Kadar FSH	K0 (n=5)	Normal	50.259	2.705	.000
	K1 (n=5)	Tidak estrus	14.877	10.589	.000
Kadar LH	K0 (n=5)	Normal	17.015	0.960	.000
	K2 (n=5)	Tidak estrus	4.824	3.591	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K0 (n=5) K2 (n=5)	Normal	13.592	0.443	.000
		Tidak estrus	6.905	2.028	.000

Analisa

Dari tabel di atas dapat di ketahui bahwa ada perbedaan dinamika penurunan hormon setelah perlakuan antara kelompok K0 dengan K2 yang berefek pada siklus estrus. Pada kelompok 2 (2 gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 3,35 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 3,37 kali dan penurunan kadar LH 3.58 kali, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 1,96 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (K0). Siklus estrus kelompok perlakuan 2

(K2) tidak mengalami fase estrus dan siklus estrus kelompok kontrol (K0) Normal (4-5 hari) yang artinya ada hubungan secara signifikan (masing-masing P= 0.000) antara hormon dengan siklus estrus setelah pemberian ekstrak biji pinang dosis 2gr/200gr BB mencit (K2) selama 7 hari dengan kelompok kontrol (aquades) .

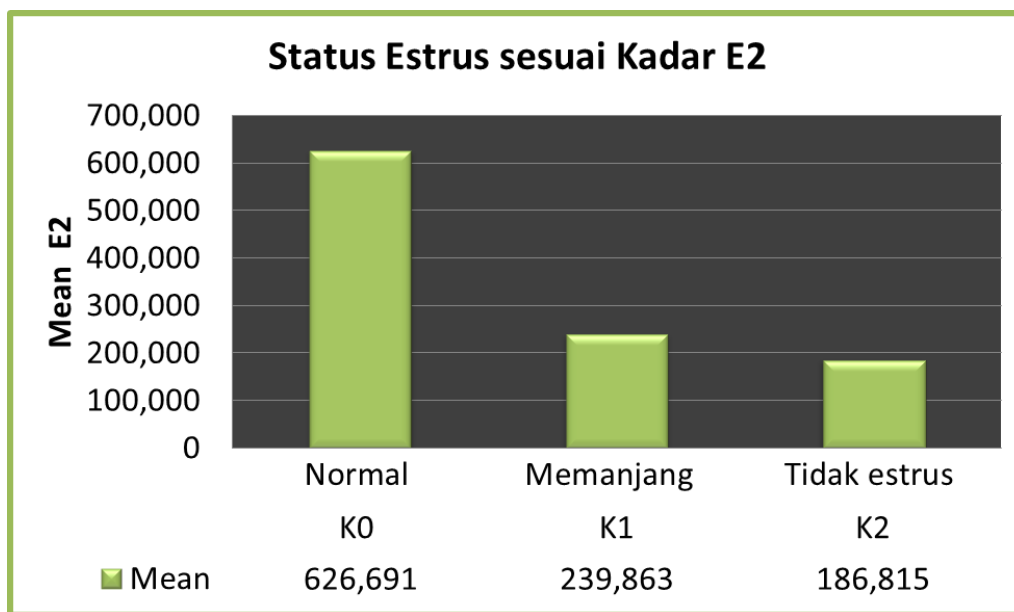
Tabel 9: hubungan siklus estrus kelompok perlakuan 1 (memanjang) dengan kelompok perlakuan 2 (tidak estrus)

Variabel	Kelompok	Status estrus	Mean	SD	P
Kadar estradiol	K1 (n=5) K2 (n=5)	Memanjang	239.863	121.318	.000
		Tidak estrus	186.815	133.364	.000
Kadar FSH	K1 (n=5)	Memanjang	19.159	9.614	.000
	K2 (n=5)	Tidak estrus	14.877	10.589	.000
Kadar LH	K1 (n=5)	Memanjang	6.324	3.335	.000
	K2 (n=5)	Tidak estrus	4.824	3.591	.000
Ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron	K1 (n=5) K2 (n=5)	Memanjang	7.957	1.568	.000
		Tidak estrus	6.905	2.028	.000

Analisa

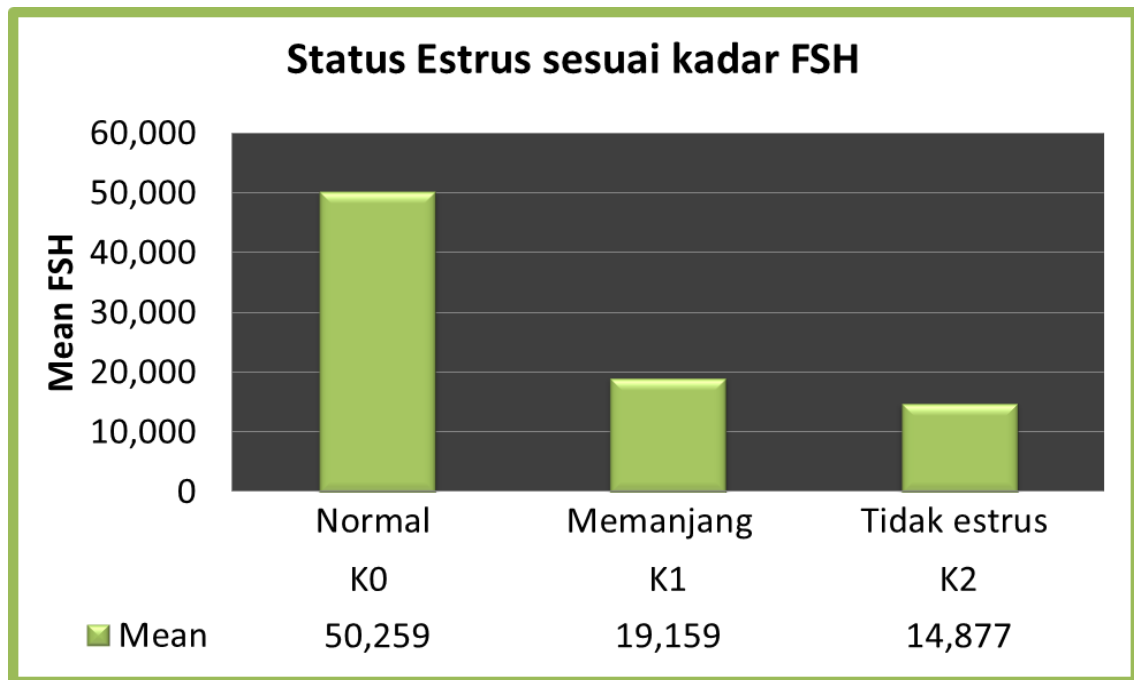
Dari tabel di atas dapat di ketahui bahwa ada perbedaan dinamika penurunan hormon setelah perlakuan antara kelompok K1 dengan K2 yang berefek pada siklus estrus. Pada kelompok 2 (2 gr/200gr BB mencit selama 7 hari) terjadi penurunan kadar estradiol 1,28 kali, penurunan kadar FSH sebanyak 1.28 kali dan penurunan

kadar LH 1.31 kali, penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron 1,15 kali dibandingkan dengan kelompok kontrol (K0). Siklus estrus kelompok perlakuan 2 (K2) tidak mengalami fase estrus dan siklus estrus kelompok 1 (K1) memanjang yang artinya ada hubungan secara signifikan (masing-masing P= 0.000) antara hormon dengan siklus estrus setelah pemberian ekstrak biji pinang dosis 2gr/200gr BB mencit (K2) dengan dosis 1gr/200gr BB mencit (K1) selama 7 hari.



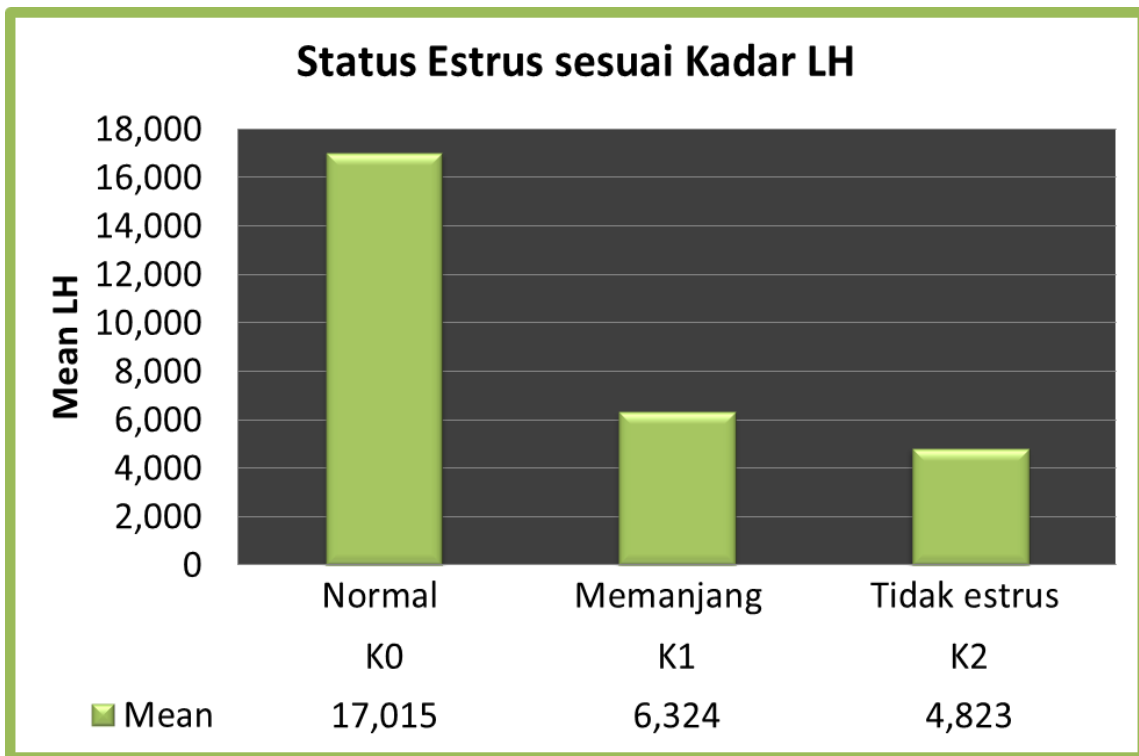
Gambar 27. Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar estradiol

Dari gambar 27 di atas dapat dilihat bahwa status estrus setelah penurunan kadar estradiol serum pada kelompok perlakuan 1 (K1) fase estrus di temukan dengan siklus yg memanjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) tidak di temukan fase estrus selama 3 x siklus estrus normal dan pada kelompok kontrol (K0) tidak terjadi perubahan fase estrus (normal =4-5 hari)

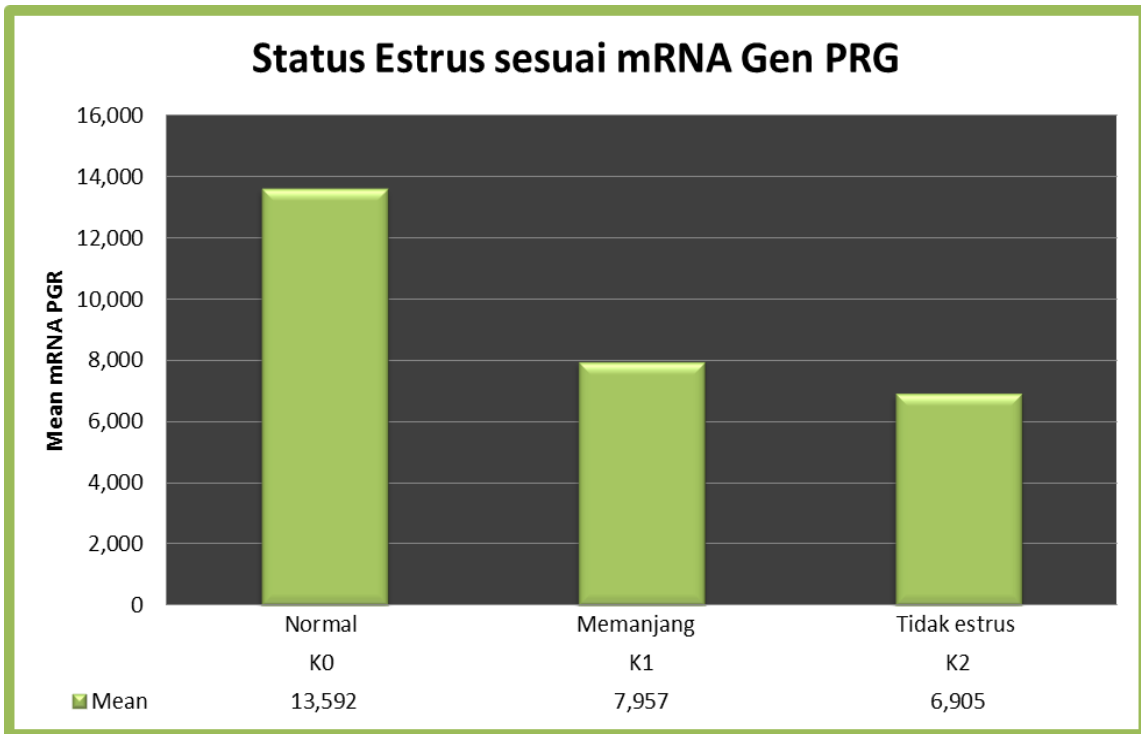


Gambar 28. Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar FSH

Dari gambar 28 di atas dapat dilihat bahwa status estrus setelah penurunan kadar FSH serum pada kelompok perlakuan 1 (K1) fase estrus di temukan dengan siklus yg lebih panjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) tidak di temukan fase estrus selama 3 x siklus estrus normal dan pada kelompok kontrol (K0) tidak terjadi perubahan siklus estrus (normal =4-5 hari)



Gambar 29. Perubahan Status estrus sesudah penurunan kadar LH Dari gambar 29 dapat dilihat bahwa status estrus setelah penurunan kadar LH serum pada kelompok perlakuan 1 (K1) fase estrus di temukan dengan siklus yg memanjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) tidak di temukan fase estrus selama 3 x siklus estrus normal dan pada kelompok kontrol (K0) tidak terjadi perubahan fase estrus (normal =4-5 hari)



Gambar 30. Perubahan Status estrus sesudah penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron

Dari gambar 30 dapat dilihat bahwa status estrus setelah penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron pada kelompok perlakuan 1 (K1) fase estrus di temukan dengan siklus memanjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) tidak di temukan fase estrus selama 3 x siklus estrus normal dan pada kelompok kontrol (K0) tidak terjadi perubahan fase estrus (normal =4-5 hari)

PENGARUH HORMON TERHADAP ESTRUS

Tabel 10: Pengaruh hormon terhadap siklus estrus

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Progesteron	Between Groups	120.358	2	60.179	30.400	.000
	Within Groups	23.755	12	1.980		
	Total	144.113	14			
E2pgpermL	Between Groups	546579.837	2	273289.918	25.634	.000
	Within Groups	127933.508	12	10661.126		
	Total	674513.344	14			
FSHngper mL	Between Groups	3534.392	2	1767.196	26.242	.000
	Within Groups	808.108	12	67.342		
	Total	4342.500	14			
LhngpermL	Between Groups	418.486	2	209.243	26.098	.000
	Within Groups	96.213	12	8.018		
	Total	514.699	14			

Analisa

Dari tabel di atas dapat diketahui bahwa ada hubungan antara ekspresi mRNA gen reseptor Progesteron serum dan penurunan kadar Estradiol, FSH, LH dengan status estrus secara signifikan (masing-masing $P= 0.000$) setelah pemberian ekstrak biji pinang dosis 1gr/200gr BB mencit dan dosis 2gr/200gr BB mencit selama 7 hari dibanding kelompok kontrol (K0).

BAB V

PEMBAHASAN

Hormon berperan penting dalam siklus reproduksi. Kemajuan dalam pemahaman kita tentang kompleksitas tindakan GnRH pada hipofisis dan berbagai mekanisme yang terlibat dalam mediasi LH diferensial dan biosintesis FSH dan sekresi di gonadotropin itu, terus muncul. Gonadotropin, hormon luteinizing (LH) dan follicle-stimulating hormone (FSH), yang diproduksi secara eksklusif dalam sel gonadotropin dari hipofisis anterior dan disekresikan ke dalam darah di mana mereka mengatur steroidogenesis dan gametogenesis dalam gonad. Sintesis dan sekresi LH dan FSH dipengaruhi oleh GnRH. Sintesis dan sekresi LH dan FSH yang diatur baik secara positif maupun negatif oleh steroid dan gonad peptida (Brown P. And Mc. Neilly, 1999). Folikel stimulating hormone (FSH) sebagai sejenis gonadotropin, FSH disekresikan dengan basofilik sel-sel hipofisis anterior dan memiliki peran penting dalam produksi hormon gonad dan Proses regulasi reproduksi (Cross D. Et. Al. 2004) Reseptor FSH adalah protein G- ditambah reseptor, yang terutama diekspresikan pada Sertoli Sel testis dan sel granular ovarium (Findlay JK. Drummond AE, 1999). Sebagai atasan Hormon FSH dalam hipotalamushipofisis-gonad (HPG) Sumbu, GnRH terutama disekresikan dari neuron hipotalamus Ke dalam pleksus kapiler dari median eminence dan mencapai Hipofisis anterior, dikombinasikan dengan reseptor GnRH ke regulasi akhir sekresi FSH (Fujii S. Et. al. 2001). Follicle-stimulating hormone (FSH) merangsang pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium, tempat berkembangnya ovum atau sel telur serta mendorong sekresi hormon estrogen

oleh ovarium. Maksimal FSH adalah prediktor terbaik untuk cadangan ovarium berbasis FSH (Julian A. et.al. 2015) Reseptor FSH dinyatakan hanya dalam sel granulosa ovarium (pasoula E. et.a.2001). Luteinizing hormone (LH) pembentukan korpus luteum penghasil hormon di ovarium setelah ovulasi serta mengatur hormon estrogen dan progesterone (Thacykray VG. 2014). Hormon steroid yang terlibat dalam siklus estrus yang dihasilkan oleh ovarium adalah estrogen dan progesterone. Estrogen adalah senyawa steroid yang berfungsi sebagai hormon reproduksi pada betina. Hormon tersebut bertanggung jawab untuk pertumbuhan dan perkembangan vagina, uterus, dan organ penting untuk transportasi ovum, pematangan zigot, dan konsepsi implantasi zigot. Androgen yang dikeluarkan dari ovarium diubah menjadi estrogen karena jaringan tubuh tertentu (khususnya, jaringan adiposa) mengekspresikan aromatase. Tingkat estrogen yang terus-menerus ini menyebabkan regulasi umpan balik abnormal dari sekresi gonadotropin, sehingga sekresi LH tetap tinggi relatif terhadap sekresi FSH. Hyperinsulinemia berkontribusi pada masalah ini karena insulin merangsang produksi androgen ovarium. Selain itu, hormon estrogen terlibat dalam penebalan endometrium maupun dalam pengaturan siklus estrus. Oleh karena itu, kandungan estrogen jauh lebih tinggi dalam tubuh tikus betina yang berada pada usia subur (Hadley, M.E. 2000). Masa subur ditandai dengan dilepaskannya sel telur betina matang melalui peristiwa ovulasi (Sophia, R.A. 2003). Pada masa tersebut, hormon estrogen mencapai kadar maksimal dan kemudian menurun drastis. Setelah ovulasi terjadi, rendahnya kadar estrogen akan digantikan dengan mulai meningkatnya kadar progesteron. Kenaikan 17- β -estradiol secara tidak langsung merangsang hormon gonadotropin-releasing neuron di hipotalamus dan septum, pada

gilirannya, mengaktifkan sel-sel responsif di hipofisis anterior untuk melepaskan hormon luteinizing dan follicle-stimulating hormone ke dalam sirkulasi (Sarkar., D.K. et.al. 1976).

Progesteron adalah hormon steroid yang terlibat dalam siklus estrus dan kehamilan. Progesteron termasuk kelas hormon progestagen. Progesteron merupakan faktor yang mendukung kelangsungan hidup sel granulosa tikus pada masa periovulatory oleh tindakan klasik reseptor progesteron nuklir

(PGR) sinyal jalur tikus sel granulosa periovulatory. (Friberg PA, 2007)

Progesteron diproduksi oleh korpus luteum dalam ovarium setelah ovulasi dan dalam kelenjar adrenal yang terletak di dekat ginjal, serta di dalam plasenta selama kehamilan (Hadley, M.E. 2000) > 85% progesteron yang diproduksi oleh korpus luteum (Niswender et al., 1985). Sekresi progesteron dari besar Sel luteal mungkin bersifat konstituen, sebagai faktor yang akut merangsang sekresi progesteron dari sel-sel ini memiliki efek yang agak sederhana (biasanya kurang dari dua kali lipat) dibandingkan dengan kenaikan 5-15 kali lipat yang tercatat kecil sel luteal. Sebagai pengangkutan kolesterol dari sitosol ke membran mitokondria bagian dalam tampaknya menjadi kuncinya. Proses dalam pengaturan akut sekresi progesteron, nampaknya ada perbedaan dalam pengendalian progesteron. Sekresi dari dua jenis sel luteal melibatkan perbedaan- ences dalam fungsi dari tiga protein yang diketahui terlibat dalam proses ini (Gordon D. Niswender. 2002)

Peningkatan kadar progesteron menandakan ovulasi telah terjadi dan kadar progesteron akan mencapai puncaknya pada fase midluteal siklus. Fluktuasi

kadar hormon- hormon tersebut merupakan respons terhadap bekerjanya hormon-hormon hipofisis pada organ ovary (Champbell, A.N. et.al. 2004).

Progesteron bertanggung jawab mempersiapkan sistem reproduksi untuk implantasi zigot. Hal tersebut menunjukkan bahwa progesteron yang berada pada plasma preovulatori dapat memicu perilaku seksual pada beberapa spesies. Progesteron memiliki peranan dominan dalam mengatur siklus estrus (Hadley, M.E. 2000). Kadar progesteron dalam darah tikus pada awal siklus estrus kurang dari 5 ng/ml, setelah ovulasi kadarnya lebih dari 5 ng/ml (Cameron, E.H.D and J.J Scarisbrick. 1973). Progesteron dianggap dapat mewakili teridentifikasinya peristiwa ovulasi. Progesteron hanya akan disekresikan melalui suatu badan yang terbentuk setelah ovulasi terjadi. Setelah ovulasi terjadi, kadar progesteron mulai meningkat, dan terus meningkat sampai mencapai jumlah maksimal (Champbell, A.N. et. al.2004). Fluktuasi kadar progesteron sepanjang siklus memberi gambaran lengkap profil hormon progesteron. Kadar progesteron pada saat non-estrus meningkat empat kali dibandingkan pada masa estrus (Sjahfirdi L. Et. al.2013). Peran progesteron pada epitel mukosa vagina yang kurang jelas namun data menunjukkan bahwa mereka mungkin memiliki efek antagonis ringan efek estradiol pada mukosa vagina (Pessina MA. 2005)

Perubahan histologis dan sitologi mukosa vagina tergantung hormon steroid seks. Hormon utama yang mendorong perubahan mukosa vagina adalah estradiol (Gal Arnon, et. al. 2014)

Siklus reproduksi adalah proses berulang yang terjadi pada sistem reproduksi hewan betina dewasa yang memperlihatkan perubahan organ-organ reproduksi tertentu. Organ-organ tersebut adalah organ-organ reproduksi,

sepertiovarium, oviduk, uterus, dan vagina. Siklus reproduksi pada mamalia (primata) disebut dengan siklus menstruasi, sedangkan siklus reproduksi pada non-primata (tikus) disebut siklus estrus (Champbell, A.N. et. al.2004). Siklus estrus adalah proses berulang yang menggambarkan perubahan kadar hormon reproduksi yang disebabkan oleh aktivitas ovarium di bawah pengaruh hormon pituitari. Perubahan kadar hormon reproduksi selanjutnya menyebabkan perubahan struktur pada jaringan penyusun saluran reproduksi (Champbell, A.N. et. al.2004). Panjang Siklus estrus dan frekuensi siklus reproduksi pada masing-masing organisme berbeda-beda. Pada tikus, siklus estrus berlangsung selama sekitar 4-5 hari (dan selama periode ini, mukosa vagina mengalami luar biasa perubahan struktural (Li S, Davit B. 2007).

Pada penelitian ini terjadi penurunan kadar FSH, LH, E2 dan penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron setelah di berikan perlakuan EP dengan dosis 1gr/200gr/BB mencit (K1) 1- 2 kali dan 4-5 kali setelah di berikan EP dengan dosis 2gr/200grBB mencit (K2) di banding dengan kelompok kontrol (K0). Penurunan kadar hormon berpengaruh secara signifikan (sig 0.000) terhadap siklus estrus mencit, dimana status estrus kelompok perlakuan 1 (K1) memanjang dan kelompok perlakuan 2 (K2) tidak di temukan fase estrus. Beberapa penjelasan dari efek yang di timbulkan pada kadar FSH, LH, E2 dan penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron dan siklus estrus setelah pemberian ekstrak pinang dapat di jelaskan di bawah ini:

A. Efek Apoptosis ekstrak biji pinang pada Sel

Paparan alkaloida-alkaloida yang terkandung dalam ekstrak biji pinang kemungkinan menyebabkan kerusakan DNA sel-sel jaringan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Sinha dan Rao (1985) bahwa *arecoline* sebagai alkaloida utama biji pinang dapat menyebabkan kerusakan DNA sel-sel germinal. Kerusakan DNA suatu sel menyebabkan sel menjadi stress dan ini memicu sel untuk melakukan proses apoptosis. EP akan memacu apoptosis. (Friberg PA, 2009) Hal ini memungkinkan ekstrak biji pinang memberi efek antiovolatory (Circosta C, Sanogo R. 2001)

Ekstrak biji pinang memberi efek fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis pada sel. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan EP menyebabkan terjadinya apoptosis yang dimulai hilangnya permeabilitas membran pada beberapa sel. Akibatnya *etidium bromide* dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluoresensi oranye sebagai indikator kematian sel (Meiyanto E, 2010) Selain itu, arekolin juga terbukti menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi p53, meningkatkan aktivitas caspase 3, dan menginduksi pelepasan sitokrom c oleh mitokondria pada sel hepatoma HA22T / VGH (Cheng, et.al, 2007). Pengikatan p53 oleh E6 mengakibatkan degradasi peningkatan kecepatan degradasi protein tersebut. Arekolin mampu meningkatkan ekspresi p53 serta meningkatkan ekspresi gen pengkode p21WAF1 (Chou, et al., 2009). Mekanisme antikanker arekolin adalah melalui induksi apoptosis. Arekolin juga dapat menginduksi *DNA strand break* pada sel mamalia (Chang, et al., 2009).

Pengamatan terhadap morfologi sel setelah perlakuan arekolin tunggal menunjukkan jumlah sel yang mengalami kematian (sel berbentuk bulat dan

melayang) meningkat sesuai dengan konsentrasi arekolin yang diberikan. Uji sitotoksik tunggal arekolin pada sel HeLa menunjukkan aktivitas sitotoksik arekolin terhadap sel HeLa meningkat seiring peningkatan dosis. Ini menunjukkan arekolin tidak memiliki efek sitotoksik yang kuat terhadap sel HeLa seperti alkaloid lain skimmianin, flindersin, dan haplopin (Jansen, *dkk.*, 2006). Arekolin juga bisa menginduksi untai *DNA break* pada sel mamalia (Chang, *et al.*, 2009). Arekolin menurunkan produksi interleukin-6 dan menghambat fosforilasi STAT3 sehingga produksi protein Bcl-XL dan Bcl-2 menurun (Chang, *et al.*, 2004). Pengamatan apoptosis sel hidup akan berfluoresensi hijau terang (dengan akridin oranye), sel yang mengalami apoptosis tahap awal akan mengalami kondensasi kromatin dan masih berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis pada tahap akhir akan terpecah-pecah menjadi bagian yang lebih kecil dan berwarna oranye (dengan etidium bromida) (Renvoize, *et al.*, 1998). Kematian sel terprogram (PCD) adalah proses aktif secara fisiologis yang penting untuk berfungsinya jaringan kehidupan. Pengaruh hormon steroid pada kematian sel adalah jaringan spesifik. Hormon yang sama dapat menghambat Kematian sel terprogram (PCD) dalam satu jaringan, dan dapat meningkatkan PCD di jaringan lain. Peran apoptosis dan diferensiasi terminal telah diperiksa, dan regulasi PCD dengan hormon steroid. (Pushkala K, Gupta PD. 2001). Hormon steroid mengatur metabolisme, reproduksi, dan perkembangan pada hewan yang berbeda seperti serangga dan manusia. Selama pengembangan hewan, steroid memicu respons yang berbeda termasuk diferensiasi sel dan kematian sel terprogram. Hormon androgen, estrogen, progesteron, glukokortikoid dan ecdysteroids mengatur kematian sel, studi intensif terhadap proses ini telah menghasilkan banyak informasi baru

mengenai bagaimana hormon lipofilik kecil berkontribusi terhadap kematian sel di dalam organisme. Mekanisme yang menghubungkan tindakan hormon dengan pengaktifan eksekusi apoptosis, kompleks proses, yang kurang dipahami sejauh ini. (Kucharova S, Farkas R. 2002).

Hal lain yang dapat menyebabkan apoptosis adalah reseptor progesteron (PGR) antagonis telah terbukti menghambat sintesis kolesterol dan menginduksi apoptosis. Statin menginduksi apoptosis dengan menghambat isoprenylation protein. Statin menghambat atau membatasi sintesis kolesterol, sehingga mengurangi ketersediaan intermediet untuk proses isoprenylation pasca-translasi. PGR antagonis dengan cara yang sama menginduksi apoptosis dengan menurunkan sintesis kolesterol dan dengan demikian isoprenylation protein. Mekanisme dimana nuklir PGR antagonis Org 31.710 menginduksi apoptosis pada sel granulosa tikus periovulatory, dengan mengurangi sintesis kolesterol dan isoprenylation protein sel. Antagonis PGR menghambat sintesis kolesterol dalam sel granulosa dengan mengurangi isoprenylation protein tidak peningkatan mekanisme mediasi apoptosis. (Friberg PA, 2007) Tidak adanya PGR fungsional dikaitkan dengan defisit sepanjang sumbu reproduksi (misalnya, hipotalamus / hipofisis, ovarium, rahim, dan kelenjar susu) (Li S, Davis B. 2007)

Progesteron, bertindak melalui progesteron nuklir reseptor (PGR), mengurangi apoptosis pada sel granulosa periovulatory, dan merupakan mediator kemungkinan tindakan anti-atretic LH. Mekanisme yang mendasari, bagaimanapun, belum jelas. Dalam studi ini, kami berusaha untuk mengidentifikasi perubahan transkripsi progesteron-dimediasi terlibat dalam regulasi apoptosis. Sel granulosa dari dewasa, tikus betina gonadotropin-prima

dirawat di vitro dengan 100 nM dari PGR antagonis Org 31710. efek transkripsi dianalisis setelah 5 dan 22 jam inkubasi menggunakan mikroarray, dan ekspresi gen 85 kemudian diukur dengan PCR kuantitatif. Tindak lanjut percobaan difokuskan pada gen yang terkait dengan fungsional kelompok —apoptosisll. Kami telah mengidentifikasi Novel, target gen awal PGR yang mungkin terlibat dalam mengontrol apoptosis dan fungsi biologis penting lainnya dalam sel granulosa periovulatory. Penelitian ini memperluas pengetahuan kita tentang peristiwa yang terjadi proses ovulasi dan luteinisasi. (Friberg PA, 2010)

B. EP (arecoline): Aktifitas hipoglikemik

Arecoline diselidiki dan dilaporkan memiliki aktivitas hipoglikemik di model hewan diabetes pada subkutan administrasi. Administrasi subkutan dari fraksi alkaloid dari *Areca catechu* menjadi alloxanized. Efek hipoglikemik yang signifikan berlangsung selama 4/6 jam (B Chempakam.1993). Ekstrak arecanut memiliki α -glukosidase yang manjur inhibitor dan akan efektif dalam Penekanan elevasi glukosa darah setelah oral pemberian maltosa pada tikus (M Senthil Amudhan, V. Hazeena Begum. 2008). Glukosa merupakan sumber energi esensial yang digunakan untuk berbagai proses metabolisme. Glukosa merupakan substrat dari proses glikolisis yang selanjutnya akan di teruskan ke siklus krebs. Gglukosa dapat bekerja pada dua sel yang berbeda yaitu sel otot dan sel lemak. Di sel lemak glukosa di gunakan untuk sintesi trigliserida yang berperan penting sebagai sumber energi. Hasil penelitian David R Garris, et.al (1985) menyimpulkan perubahan penggunaan glukosa oleh jaringan saluran reproduksi sensitif steroid dapat mendasari terganggunya kemampuan

reproduksi. Insulin merupakan kunci yang membuka pintu sel jaringan, memasukkan gula dalam sel dan menutup pintu kembali. Insulin merangsang produksi androgen ovarium (Callum LIVINGSTONE, et.al.2002) Ada Korelasi yang signifikan antara kadar basal insulin plasma, androstenedion, dan testosteron, ditemukan antara daerah respon insulin plasma dan testosteron.

Hiperandrogenisme berkorelasi dengan hiperinsulinisme. (George A.1980).

EP (arecoline): Aktifitas Hypolipideatik

Ekstrak buah pinang ditemukan menunjukkan aktivitas penghambatan kolesterol yang kuat pada tikus dengan kadar kolesterol tinggi. Dalam studi lain, tikus diberi makan makanan yang mengandung minyak jagung dengan pinang ekstrak suplemen Suplementasi dari ekstrak arecanut secara signifikan menurunkan penyerapan trigliserida dan lipid plasma konsentrasi (Byun S.J. Et.al. 2001) Kolesterol yang digunakan untuk sintesis steroid oleh jaringan ovarium dapat berasal dari sintesis serapan seluler kolesterol lipoprotein.

Mayoritas kolesterol darah diangkut dengan lipoprotein densitas rendah (LDL) atau tinggi (HDL), tergantung pada spesies hewan. Sebelum vaskularisasi, hanya HDL yang berada dalam cairan folikuler dan memberi kontribusi sterol pada sel granulosa karena lipoprotein lain tidak dapat melintasi membran dasar karena massa molekulnya. Setelah vaskularisasi, baik LDL dan HDL memandikan sel luteal. Sebagian besar spesies secara khusus menggunakan kolesterol LDL sebagai prekursor sintesis steroid ovarium. Serapan LDL oleh jaringan ovarium terjadi oleh endositosis yang dimediasi reseptor. Reseptor mengenali apolipoprotein B dari LDL dan apolipoprotein E ditemukan pada beberapa, tapi tidak semuanya, HDL. Dalam sebuah spesies, ada hubungan

positif antara kandungan HDL apolipoprotein E dan pentingnya kolesterol HDL sebagai prekursor untuk steroidogenesis. Kolesterol yang digunakan untuk sintesis steroid oleh jaringan ovarium dapat berasal dari sintesis serapan seluler kolesterol lipoprotein. Mayoritas kolesterol darah diangkut dengan lipoprotein densitas rendah (LDL) atau tinggi (HDL), tergantung pada spesies hewan. Ada tiga protein penting telah diidentifikasi terlibat dalam pengangkutan kolesterol dari luar ke membran mitokondria bagian dalam. Ketiga protein ini Star, reseptor benzodiazepin tipe perifer (PBR) dan endozepin, ligan alami untuk PBR. (Gordon D. Niswender. 2002) Dengan demikian, ada bukti kuat bahwa setidaknya tiga Protein berperan dalam mengatur pengangkutan kolesterol melintasi membran mitokondria. Fakta bahwa transportasi kolesterol di seluruh membran mitokondria tampaknya terjadi langkah membatasi laju steroidogenesis.

Siklus estrus

Siklus estrus dibedakan dalam 2 fase, yaitu fase folikular dan fase luteal. Fase folikular adalah pembentukan folikel sampai masak, sedangkan fase luteal adalah fase setelah ovulasi, kemudian terbentuknya korpus luteum dan sampaimulainya siklus. Siklus estrus terdiri dari 4 fase, yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Setiap fase dalam siklus ditentukan berdasarkan bentuk sel epitel pada pengamatan sitologi vagina (Byers S.L. et.al. 2012).

Sitologi sitokin vagina mencerminkan kejadian endokrin yang mendasarinya (Hawkins, S.M & Matzuk, M.M. 2008). Vagina sitologi eksfoliatif dapat digunakan sebagai panduan umum untuk menentukan diinginkan endpoint tahap estrus, dan konfirmasi definitif tahap estrus diperoleh dari evaluasi vagina (Gal Arnon, et. al. 2014). Vagina eksfoliatif sitologi adalah alat mapan

untuk penilaian dan klasifikasi dari tahap siklus estrus tikus (Gupta, P.D. et.al. 1989). Tahap ini kemudian mutlak, dan tidak ada langkah-langkah diagnostik lainnya yang diambil untuk memastikan bahwa vagina Hasil sitologi dalam klasifikasi yang benar dari siklus estrus (Cohen P.E.et.al. 2002) Mengkorelasikan tingkat estradiol, dan serum gonadotropin dengan tahap siklus estrus sampel darah pagi tunggal sudah cukup untuk menunjukkan perubahan estradiol serum di seluruh siklus estrus (Gal Arnon, et. al.2014). Pengambilan sampel setiap hari untuk tingkat serum estradiol oleh phlebotomy tidak dapat dianggap sebagai alat yang baik untuk memantau tahap estrus pada tikus, karena dapat menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tidak beralasan (Forbes N. Et. al. 2010)

Proestrus

Fase proestrus dari siklus estrus sesuai dengan fase folikuler manusia dari siklus menstruasi (Hawkins, S.M & Matzuk, M.M. 2008). Selama proestrus pap vagina mengandung banyak sel epitel berinti dan beberapa leukosit (Marcondes F.K. et.al. 2002). Pada fase Proestrus konsentrasi estradiol serum lebih tinggi dari semua tahap estrus lainnya , konsentrasi FSH cenderung lebih tinggi selama proestrus (Gal Arnon, et. al. 2014)

Estrus

Selama estrus ada ditandai kornifikasi dari sel-sel dan hilangnya leukosit. Pap vagina ditandai dengan deteksi hampir eksklusif sel epitel skuamosa cornified tidak teratur berbentuk sering dalam rumpun (Marcondes F.K.et.al. 2002). Di bawah pengaruh estradiol epitel mukosa vagina stratified dan menjadi cornified. Di sisi lain, penarikan estradiol mengarah ke deskuamasi yang luas dari epitel mukosa ke lumen vagina. Selama estrus, konsentrasi serum

estradiol secara signifikan lebih rendah daripada proestrus (p -value $<0,001$) lebih tinggi dari metestrus. Masuk ke metestrus bertepatan dengan kenaikan terus-menerus kadar hormon progesterone. Estrus, $17\text{-}\beta$ -estradiol menurun dan kadar

prolaktin puncak (Gal Arnon, et. al. 2014)

Metestrus

Dalam perjalanan metestrus, yang Lapisan cornified sloughed dan invasi mukosa oleh leukosit terjadi, Jenis sel hadir dalam apusan vagina selama tahap ini terfragmentasi, sel-sel epitel cornified dan gelap kecil leukosit patri (Marcondes F.K. et.al. 2002) Serum estradiol semakin meningkat dari metestrus melalui proestrus. Selama metestrus, konsentrasi estradiol serum secara signifikan lebih rendah dari proestrus, estrus dan diestrus, konsentrasi LH cenderung lebih tinggi selama proestrus dan metestrus (Gal Arnon, et.al.2014). Sebagai tingkat progesteron mulai meningkat dan ada lonjakan kecil di $17\text{-}\beta$ - tingkat estradiol dalam menanggapi aktivasi korpus luteum (Walmer, D.K. et.al.1992). Regresi dari korpus luteum menyebabkan penurunan tajam berikutnya di tingkat progesterone (Stocco, C. et. al.2007). Akhirnya, masuk ke diestrus pada tikus terjadi dan tingkat sirkulasi progesteron puncak (Walmer, D.K. et. al. 1992)

Diestrus

Pada fase diestrus isi vagina konsisten kekurangan sel cornified dan leukosit mendominasi di smear. Frekuensi sel epitel cornified berkurang dan sel epitel berinti mulai terdeteksi hanya sebelum transisi ke proestrus (Marcondes F.K. et.al. 2002). Konsentrasi serum LH dan FSH tidak berbeda secara statistik

melintasi seluruh siklus estrus.. Konsentrasi estradiol serum lebih rendah dari proestrus dan lebih tinggi dari metestrus (Gal arnon, et.al.2014).

Efek ekstrak etanol dari *A. catechu* pada durasi fase estrus cycle yang berbeda, berat badan ovarium, kadar kolesterol, dan histopatologi dipelajari pada tikus. Selama siklus estrus banyak perubahan fisiologis, biokimia, morfologi, dan histologis terjadi di ovarium. Pertumbuhan folikel dan ovulasi diatur oleh endokrin (hormon perangsang folikel, hormon luteinizing, dan prolaktin) dan hormon ovarium (seperti progestin, estrogen, dan androgen). Hormon ovarium diproduksi oleh jenis sel ovarium yang berbeda seperti sel granulosa folikel dewasa dan korpus luteum. (Guraya SS. 1998). Ketidakseimbangan hormon ini menyebabkan ketidakteraturan fungsi ovarium dan durasi siklus estrus (Circosta C. & Sanogo R. 2001). Hal ini membuktikan bahwa kadar estradiol yang menurun setelah pemberian ekstrak biji pinang mengakibatkan perubahan durasi siklus estrus. Memanjangnya fase diestrus menunjukkan tidak tersedianya folikel graafian matang atau non maturasi folikel sekunder. umpan balik positif estrogen yang merangsang sintesis neuroprogesterone de novo untuk memicu lonjakan luteinizing hormon yang penting untuk ovulasi (Sinchak K. and Edward J. Wagner, 2012) tidak terjadi. Pada tahap diestrus konsentrasi estradiol serum lebih rendah dari proestrus (Gal Arnon, at. al 2014)

BAB VI

KESIMPULAN

6.1 KESIMPULAN

1. Ekstrak biji pinang (EP)/*Arecacatechu* L. menunjukkan efek yang signifikan pada penurunan kadar hormon estradiol mencit balb/c betina dewasa
2. Ekstrak biji pinang (EP)/*Arecacatechu* L. menunjukkan efek yang signifikan pada penurunan kadar hormon FSH mencit balb/c betina dewasa
3. Ekstrak biji pinang (EP)/*Arecacatechu* L. menunjukkan efek yang signifikan pada penurunan kadar hormon LH mencit balb/c betina dewasa
4. Ekstrak biji pinang (EP)/*Arecacatechu* L. menunjukkan efek yang signifikan pada penurunan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron mencit balb/c betina dewasa
5. Ekstrak biji pinang (EP)/*Arecacatechu* L. menunjukkan efek yang signifikan mengganggu siklus estrus mencit pada balb/c betina dewasa melalui pengaruhnya pada penurunan kadar hormon estradiol, FSH, LH dan ekspresi mRNA gen reseptor progesteron

6.2 SARAN

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk meneliti caspase 3/7 atau marker lain yang dapat menjelaskan mekanisme terjadinya penurunan kadar hormon reproduksi dan siklus estrus di dalam tubuh yang belum di masukkan dalam penelitian ini.
2. Diperlukan studi lebih lanjut untuk menguji manfaat ekstrak biji pinang (EP)/Arecacatechu L secara klinis sebagai kandidat anti fertilitas
3. Perlu di galakkan kembali bagi masyarakat umum untuk membudidayakan penanaman pinang agar dapat di jadikan alternatif solusi menurunkan tingkat fertilitas.

DAFTAR PUSTAKA

- A Dar, S Khatoun, (2000). Behavioral and biochemical studies of dichloromethane fraction from the Areca catechu nut. *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 65, 1 -/6.
- Akbar, B. 2010. Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Anti Fertilitas. Adabia Press. Jakarta.
- Akmal M, Chanif Mahdi, Aulanni'am, (2010), Peningkatan Konsentrasi Testosteron pada Tikus Akibat Paparan Ekstrak Air Biji Pinang, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, *Jurnal Veteriner Desember 2010, Vol. 11 No. 4* : 244-250
- Akmal M, Aulanni'am, Rosmaidar (2008), Efek paparan dekok biji pinang (areca catechu) terhadap motilitas spermatozoa tikus (*rattus norvegicus*): upaya menemukan kandidat antifertilitas pria, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. *J. Ked. Hewan Vol. 2 No. 2 September 2008*
- Akmal M, Aulanni'am, Rosmaidar, (2007), Ekspresi Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Pada Jaringan Testis Tikus (*Rattus norvegicus*) Akibat Paparan Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu*). *Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIII, No. 3, Desember 2007*
- Amudhan dkk. 2012. Tinjauan potensi phytochemical dan pharmacologi areca catechu I. *Seed ijpsr, 2012; Vol. 3 (11): 4151-4157. ISSN: 0975-8232. online di www.ijpsr.com*
- Anonim, (2005), Tanaman Obat Indonesia, <http://www.iptek.net.id>. (diakses pada 27 Agustus 2008)
- Asatiani K, Gromoll J, Eckardstein SV, Zitzmann M, Nieschlag E, Simoni M (2002). "Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men". *Andrologia* 34 (3): 172–6. doi:10.1046/j.14390272.2002.00493.x. PMID 12059813.
- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL (2002). "The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective". *Endocr. Rev.* 23 (2): 141–74. doi:10.1210/er.23.2.141. PMID 11943741.
- Astrid Ayu Maruti, Rahmi Khamsita, Suven, Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri dan Edy Meiyanto*. Sinergisitas efek sitotoksik kombinasi arekolin dan doxorubicin pada sel kanker serviks HeLa Sinergisitas efek sitotoksik kombinasi arekolin dan doxorubicin pada sel kanker serviks HeLa. *Cancer*

Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Aulanni'am, Akmal, M, Rosmaidar. (2007). Efek Anfertilitas Fraksi Air Biji Pinang (*Areca catechu*) Sebagai Agen Apoptosis Pada Sel- Sel Jaringan Testis *Rattus norvegicus*. *Jurnal Media Kedokteran Hewan*. 23(3):179-183
- Azeez S, Amudhan MS. (2006), Central Plantation Crops Research Institute. Pharmacological uses of areca nut; pp. 40–2.
- B Chempakam, (1993), Hypoglycemic activity of arecoline in betel nut *Areca catechu* L., *Ind. J of Exp. Biol*;; 31 (5), 474-475.
- BJ Kim, JH Kim, HP Kim and MY Heo (1997): Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): Anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J Cosmetic Sci*; 19:299-307.
- Brown P and Mc.Neilly A.S. (1999). Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. University of Edinburgh, Edinburgh EH3 9EW, UK: *Reviews of Reproduction* 4, 117–124
- Busman H. (2013) Histologi ulas vagina dan waktu siklus estrus Masa subur mencit betina setelah pemberian Ekstrak rimpang rumput teki. FMIPA Universitas Lampung.
- Byers S.L. Michael V. Wiles, Sadie L. Dunn¹, Robert A. Taft. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. Bar Harbor, Maine, United States of America. April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | e35538. (PLoS ONE | www.plosone.org) doi:10.1371/journal.pone.0035538
- Byun SJ, Kim HS, Jeon SM, Park YB and MS Choi (2001), Supplementation of *Areca catechu* L. extract alters triglyceride absorption and cholesterol metabolism in rats. *Ann Nutr Metab*.; 45(6):279-84.
- Cameron, E.H.D. & J.J. Scarisbrick. (1973). Radioimmunoassay of plasma progesterone. *Clinical Chemistry* 19 (12): 1403—1408.
- Champbell, A.N., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. (2004). *Biologi edisi ke-5*. Jilid 3. Terj. dari *Biology 5th ed.*, oleh Manalu, W. Erlangga, Jakarta: xxii + 476 hlm.
- Chang MC, Wu, HL, Lee JJ, Lee PH, Chang HH, Hahn LJ, Lin BR, Chen YJ, Jeng JH. (2004). The Induction of Prostaglandin E2 Production, Interleukin-6 Production, Cell Cycle Arrest, and Cytotoxicity in Primary Oral Keratinocytes and KB Cancer Cells by Areca Nut Ingredients is

Differentially Regulated by MEK/ERK Activation. *J Biol Chem* 2004; 279:50676-50683.

Chia-Ching Li and En-Shyh Lin, (2010). Antiradical capacity and reducing power of different extraction method of *A. catechu* seed. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(46): 7831-7836.

Chou WW, Guh JY, Tsai JF, Hwang CC, Chiou SJ, Chuang LY. (2009). Arecoline-induced phosphorylated p53 and p21WAF1 protein expression is dependent on ATM/ATR and phosphatidylinositol-3-kinase in clone-9 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*;107(3):408–417.

Circosta C, Sanogo R. (2001). Occhiuto procera on estrous cycle and on estrogenic functionality in rats. *Farmacol*;56:373–8. [PubMed]

Cheng HL, Shu JS, Huang LW, Hsieh BS, Hu YC, Hung TC, Chang KL. (2010). Arecoline Induces HA22T/VGH Hepatoma Cells to Undergo Anoikis-Involvement of STAT3 and RhoA Activation. *Molecular Cancer*; 9:126.

Chun SY, et al. (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137(4):1447–1456.

Chutima Jantararat, Pornpak sirathanarun, wilaihong songserm, wititta srinornate and sujitra daengprom. (2012). A simple and rapid hplc technique for determination of arecoline in areca nut (*areca catechu* L.) Extract. School of pharmacy, walailak university, thasala, nakhon si thammarat 80161, thailand <http://wjst.wu.ac.th> article walailak j sci & tech 2013; 10(1): 57-66

CM De Miranda, CW van Wyk, P van der Bijl, NJ Basson, (1996). The effect of areca nut on salivary and selected oral microorganisms. *Int Dent J*. Aug. 1996; 46(4): 350-6.

Costagliola S, Panneels V, Bonomi M, Koch J, Many MC, Smits G, Vassart G (2002). "Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors". *EMBO J* 21 (4): 504–13. doi:10.1093/emboj/21.4.504. PMID 11847099.

Dalimartha, Setiawan (2009). Atlas Tumbuhan Obat Indonesia 6. Depok: Puspa Swara. ISBN 978-979-1480-19-2.

David R Garris, Douglas L Coleman and Carl R Morgan. (1985). Age- and Diabetes-related Changes in Tissue Glucose Uptake and Estradiol Accumulation in the C57BL/KsJ Mouse. *Diabetes* 1985 Jan; 34(1): 47-52.

<https://doi.org/10.2337/diab.34.1.47>

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, (1987) — Tanaman Obat Indonesia —, Jilid I, Jakarta, 1987
- Dewi, D.S.K. (2010). Identifikasi Protein Early Pregnancy Factor (EPF) dari Kotiledon Sapi Bunting. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- DLodge, GAR Johnston., DR Curtis, SJ Brands. (1977). Effects of arecaidine and guvacine areca constituents on GABA action in the cat's central nervous system, *Brain Research* ;, 136 (3), 513-522.
- Dufau ML (1998). "The luteinizing hormone receptor". *Annu. Rev. Physiol.* 60: 461–96. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.461. PMID 9558473.
- EKumarnsit, N Keawpradub, U Vongvatcharanon, K Sawangjaroen, P Govitrapong (2005). Suppressive effects of dichloromethane fraction from the Areca catechu nut on naloxone-precipitated morphine withdrawal in mice. *Fitoterapia*: 76(6):534-9.
- Effie K Chipeta, Wanangwa Chimwaza, and Linda Kalilani-Phiri (2010), Contraceptive Knowledge, Beliefs and Attitudes in Rural Malawi: Misinformation, Misbeliefs and Misperceptions, *Malawi Med J.* 2, 38–41.
- El-Hayek S, Demeesterea I and Clarkea HJ. (2014). Follicle-stimulating hormone regulates expression and activity of epidermal growth factor receptor in the murine ovarian follicle. Edited by John J. Eppig, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, and approved October 21, 2014 (received for review August 4, 2014) 16778–16783 | *PNAS* | November 25, 2014 | vol. 111 | no. 47 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1414648111)
- Emanuele, M.A., F. Wazemen, & N.V. Emanuele. (2002). Alcohol's effecton
- Fauzi A, Lucianawaty M, Hanifah L, Bernadette N. (2005). Penduduk Indonesia 2025 Akan Capai 273,65 Juta Jiwa. <http://situs.kesrepro.info/info/agu/2005/info02.htm>.
- FC Kuo, DC Wu, SS Yuan, KM Hsiao, YY Wang, YC Yang, YC Lo. (2005). The effect of arecoline in relaxing human umbilical vessels and inhibiting endothelial cell growth. *J Perinat Med*: 33 (5): 399-405.
- Firman, A. (2011). <http://adifirman.files.wordpress.com/2011/03/8e9a25c868a.jpg>

Fried, George H., Hademenos, George J.(2005). Schaum's Outlines Biologi Edisi Kedua. Jakarta: Erlangga.

Gal Arnon, Lin Po-Ching, Barger Anne M, MacNeill Amy L, and KoCheMyong, (2014), Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages Published in final edited form as, Toxicol Pathol. 42, 8, 1212–1220, (doi:10.1177/0192623314526321)

Ganong, W.F.(1999). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.Jakarta: Penerbit EGC.

Gordon D. Niswender. (2002). Molecular control of luteal secretion of progesterone* Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523-1683, USA. Reproduction and Fertility (2002) 123, 333–339

Giri S, Jeffrey RI, Chi-Chen T, Mark Z, Kristopher WK, and Gonzalez FJ. (2006). A metabolomic approach to the metabolism of the areca nut alkaloids Arecoline and araccidine in the mouse. J. Chem Res Toxicol. 19(6): 818–827.

Guraya SS. New Delhi: Narosa Publishing House (1998). Fundamentals and Biomedical Implications; pp. 10–346.

Guyton & Hall. (2007). Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Jakarta : EGC.

Guyton, A.C. (1987). Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit (Alih bahasa Andrianto, P.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Guyton,A.C.(1986). Textbook of Medical Physiolog Edisi ke-7. WB Saunders Co

Hadley, M.E. (2000). Endocrinology. Ed. Ke-5. Prentice-Hall, Inc., New Jersey

Henry L.A., Witt D.M. Resveratrol (2002) Phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. Horm. Behav. 41:220–228.ef.html.

<http://fungsi.web.id/2014/10/perbedaan-antara-talamus-dan-hipotalamus.html>

Hirozo Goto, Nobumitsu Tanaka, Kiyooki Tanigawa, Yutaka Shimada., Takashi Itoh., Katsutoshi Terasawa (1997). Endothelium -dependent vasodilator effect of extract prepared from the seeds of Areca catechu on isolated rat aorta. Phytotherapy Research. 11(6): 457-459.

- II Koleva, TA Van Beek, JPH Linssen A de Groot, LN Evstatieva (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: comparative studies on three testing methods. *Phytochemical Analysis*; 13: 8-17.
- Indah M. (2004). *Mekanisme Kerja Hormon*. Medan. USU. FK
- Isnaeni, W. (2006). *Fisiologi Hewan*. Yogyakarta: Penerbit Kaninus (Anggota IKAPI).
- Jeng JH, Chang MC, and Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis (2001) Current awareness and future perspectives. *Oral. Oncol. Pathol. Med.*; 28: 64-71.
- Jiang X, Dias JA, He X (2014). "Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling". *Mol Cell Endocrinol* 382 (1): 424–51. doi:10.1016/j.mce.2013.08.021. PMID 24001578.
- Jiang X, Liu H, Chen X, Chen PH, Fischer D, Sriraman V, Yu HN, Arkinstall S, He X (2012). "Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (31): 12491–6. doi:10.1073/pnas.1206643109. PMID 22802634.
- JC Kurian, (1995) *Plants That Heal*, Oriental Watchman Publishing House, Printed and Published by E.B. Mathews, 7th Ed, 1-20, Pune.
- J Inokuchi, H. Okabe, T Yamauchi, A Nagamatsu, G Nonaka, I am Nishioka (1986). Seed antihypertensive agents from Areca catechu L. *Life Sci*; 38 (15): 1375-82710.
- JH Lee, SH Chang, YS Park, Her E, HY Lee, JW Park, JW Han, YM Kim, WS Choi (2004). In-vitro and in-vivo anti-allergic action of Arecae semen. *J Pharm Pharmacol*; 56 (7): 927
- KK Lee, JD Choi (1999). The effects of areca catechu L extract on anti-aging. *Int J Cosmet Sci.*; 21(4):285-95.
- Kuk Kook,. JJ Lee, J Cho, Park., JD Choi (1999). The effects of Areca Catechu L Extract on Anti-Inflammation and Anti-Melanogenesis. *International Journal of Cosmetic Science* 21(4): 275.
- Kuk.-Kook JJ Lee, J Cho, Park, JD Choi, (2001) Anti-elastase and antihyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new antiageing agent. *International Journal of Cosmetic Science.*; 23(6): 341-346.
- Jansen O, Akhmedjanova V, Angenot L, Balansard G, Chariot A, Ollivier E,

- Tits M, and Frédérich M. (2006). Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum A. Juss.* for their cytotoxic properties. *Journal of Ethnopharmacology* 105(1-2):241-245 .
- Kiong Er-Tse, Eing-Mei Tsai, Li-Yu Tsai, Ying- Chin Ko, Jau-Nan Lee. (2006). In vitro effects of arecoline on sperm motility and cyclooxygenase-2 expression. *J Toxicological sciences.* 31: 75-82
- Ko YC, Chiang TA, Chang SJ, Hsieh SF. (1992). Prevalence of betel quid chewing habit in Taiwan and related sociodemographic factors. *J Oral Pathol Med* 24: 450-453.
- Kumar, V, Abbas, A K, Fausto, N. (2005). *Pathologic basic of Disease.* 7th Edition. Philadelphia: Elsevier saunders.
- Kusdiantoro, M, Hernadi, H, Djuwita, I. (2005). Allotransplantasi ovarium mencit baru Lahir ke mencit dewasa : Pengaruhnya terhadap siklus estrus resipien dan morfologi ovarium donor. *Veteriner*; 6(4): 20-25.
- Kusumaningrum R. (2009). Faktor-faktor yang mempengaruhi Pemilihan jenis kontrasepsi yang digunakan.
- Kavita Vermani, Sanjay Garg (2002). Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS, *Journal of Ethnopharmacol* 80: 49- 66.
- La Marca A, Carducci Arsenio A, Stabile G, Rivasi F, Volpe A (2005). "Evidence for cycle-dependent expression of follicle-stimulating hormone receptor in human endometrium". *Gynecol. Endocrinol.* 21 (6): 303–6. doi:10.1080/09513590500402756. PMID 16390776.
- Larasati, Naringenin (2010). Enhances The Antitumor Effect of Doxorubicin on Hela Cervical Cancer Cell Through Cytotoxic Activity and Apoptosis Induction. *Cancer Chemoprevention Research Center Yogyakarta.* unpublished data.
- Lufri dan Helendra. (2009). *Biologi Perkembangan Hewan Jilid I.* UNP Press: Padang.
- Marcondes, F.K., F.J. Bianchi, & A.P. Tanno. (2002). Determination of the estrous cycle phase of rats: some helpful considerations. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology.* 4A: 600—614.
- Mathew, A., G Govindarajan, VS (1963). Polyphenol material from arecanut II. Changes in maturation and maturation. *Phytochemistry* 3 (6): 657-65.

- McDonald, L.E. (2001). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger
- McKanna JA, Zhang M.Z, Wang JL, Cheng HF and Harris RC. Constitutive (1998). expression of cyclooxygenase-2 in rat vas deferens. *Am J. Physiol.* 275: R227-R233.
- Meiyanto E. Ratna Asmah Susidarti, Sri Handayani, dan Fitria Rahmi (2008). Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(1), 12 – 19
- Mengurai 1001 Khasiat Buah Pinang Muda.
<http://sudutbacaan.blogspot.co.id/2013/03/mengurai-1001-khasiat-buah-pinangmuda.html>
- M Iwamoto, K Uchino, T Toukairin, K Kawaguchi, T Tatebayashi, H Ogawara, Y Tonosaki (1991). Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans* by 5'nucleotidase inhibitors from *Areca catechu* *Pharm Chem Bull.* 39 (5): 13234.
- M Marastoni, A Baldisserotto, A Canella, R CD Gavioli, Risi, GP Pollini, R Tomatis. (2004). Penghambat tripeptida arecoline dari proteasome. *J Med Chem.* 1147 (6): 1587-90.
- MN Ghayur, SF Kazim, H Rasheed, A Khalid, MI Jumani, MI Choudhary, AH Gilani (2011). Identification of antiplatelet and constituents of acetylcholinesterase inhibitors in betel. *Zhong Xi Yi Jie Dia Xue Bao.* 9 (6): 619-25.
- M Ohsugi, W Fan, K Hase, Q Xiong, Y Tezuka, K., Komatsu, T Namba, T Saitoh, K Tazawa, S. Kadota (1999). Active oxygen Scavenges the traditional nutritional tonic medicinal herbs and active constituents of *Rhodiola sacra*. *J Ethnopharmacol* 67: 111-119.
- M Senthil Amudhan and V Hazeena Begum (2005). Inhibitory effect Arecanut extract on H₂O₂ induces RBC hemolysis. *Indian J Arecanut, Spices and Medicinal Plants*; 8 (3): 85-88.
- M Senthil Amudhan, and V Hazeena Begum (2008). The protective effect of *Areca catechu* extract on gastric mucosa induced by ethanol lesions in 2008 online pharmacological rats; 1: 97-106.
- Mathew, A., G Govindarajan, V.S. (1963). Polyphenolic substances of arecanut II. Changes during maturation and ripening. *Phytochemistry.* 3(6): 657-65.

- Murray, K.R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2003). *Biokimia Harper* (Alih bahasa Hartono, A.). Jakarta: Penerbit EGC.
- Mulabagal Vanisree, Chen-Yue, Lee, Shu-Fung Lo, Satish Manohar Nalawade, Chien Yih Lin, Hsin-Sheng Tsay (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot.Bull.Acd.Sin* 45:1-2
- Nadjamudin, Rusdin, Sriyanto, Amrozi, S. Agungpriyono, & T. L. Yusuf. (2010). Determination of the estrus cycle in mouse deer (*Tragulus javanicus*) based on changes in vaginal cytology. *Veterinary Journal*. 11: 81-86
- Nai-Shin Chu (2001). Effects of Betel Chewing on the Central and Autonomic Nervous Systems., *J Bio med Sci*, 8:229–236
- Nalley, W.M.M., R. Handarini, M. Rizal, R.I. Arifiantini, T.L. Yusuf, dan B. Purwantara. (2011). Determination of the estrous cycle based on vaginal cytology and hormone profile in timor hind. *Jurnal Veteriner* 12(2):98-106.
- Nonaka, GI, Hsu, FL, Nishioka I (1981). Structures of dimeric, trimeric and tetrameric procyanidins from *Areca catechu*. *J Chemical Soc Chemical Commutations* 781-783.
- Page ST, Amory JK, Bremner WJ. (2008). Advances in male contraception. *Endocrine Reviews*. 29(4):465-493.
- Pathak SP, SS Mathur: (1954). The component acids and glycerides of arecanut (*Areca catechu*) fat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 5 (10) 461-465
- Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Bletsas R, Michalas S. (2001). Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos *Reproduction*, 121: 455–461
- Pearce, E.C. (2002). *Anatomy and physiology for paramedics*. Bro. from *Anatomy and physiology for nurses*, by Handoyo, S.Y. PT. Gramedia, Jakarta: vii + 344 p.
- Piketty V, Kara E, Guillou F, Reiter E, Crepieux P (2006). "Follicle-stimulating hormone (FSH) activates extracellular signal-regulated kinase phosphorylation independently of beta-arrestin- and dynamin-mediated FSH receptor internalization". *Reprod. Biol. Endocrinol*. 4: 33. doi:10.1186/1477-7827-4-33. PMC 1524777. PMID 16787538.

- Pramono, S dan Katno. (2002). Tingkat manfaat dan keamanan tanaman obat dan obat tradisional. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Pratomo H., (2013). Peningkatan libido dan populasi sel basofil hipofisis tikus putih jantan Pengaruh pemberian pasak bumi, FMIPA, Prosiding Seminar Nasional Matematika, Sains, dan Teknologi. Volume 4, Tahun 2013, B.22-B.31
- Q Feng, G Li, Y Yang, J Gao (1999). Study of the effect of increasing components for mollusks in nuts from *Areca catechu*. *Zhong Yao Cai*. 22 (11): 572-4.
- Radu A, Pichon C, Camparo P, Antoine M, Allory Y, Couvelard A, Fromont GX, Hai MT, Ghinea N (2010). "Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Tumor Blood Vessels". *N Engl J Med* 363 (17): 1621–1630. doi:10.1056/NEJMoa1001283. PMID 20961245.
- Raghavan V, HK Baruch, Pine: Popular Indian Masticatory (1958). History, Chemistry and Utilization. *Journal of Botany Economics*. 12: 315-345.9.
- Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M., and Breard, J. (1998). Apoptosis: Identification of Dying Cells. *Cell Biology and Toxicology* 14:111-120.
- Rhoades, A.R.A. & G.A. Tanner. (1995). *Medical physiology*. Little Brown and Company, Boston: x + 839 hlm.
- Rogers, K. (2011). *Blood: physiology and circulation*. Britannica Educational Publishing, New York: 234 hlm.
- Rintafiani, (2014). Siklus Estrus pada Mencit (*Mus Musculus*). Biologi, FMIFA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS). Surabaya
- RN Chopra., SL Nayar, IC Chopra, (1996). *Glossary of Indian Medicinal Plants*, 1st Ed, 4th reprint, National Institute of Science Communication, New Delhi,
- Rusdi, (1988). Penelitian Tetumbuhan Obat Tradisional —, dalam Rusdi, *Tetumbuhan Sebagai Bahan Obat*, Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang
- Ryu KS, Gilchrist RL, Koo YB, Ji I, Ji TH (1998). "Gene, interaction, signal generation, signal divergence and signal transduction of the LH/CG receptor". *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 60 Suppl 1: S9–20. doi:10.1016/S0020-7292(98)80001-5. PMID 9833610.

- RZ Orlowski (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. 6, 303 Cell Death. Differ.
- Sacher, R.A. & R.A. Mc Person. (2002). Tinjauan klinis hasil pemeriksaan laboratorium. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: iv + 709 hlm
- Sahelian, R.M.D. (2004). Betel nut: Information on chewing areca catechu betel nut. <http://www.raysahelian.com/betelnut>.
- Sambroni E.i, Antoine D Rolland¹, Jean-Jacques Lareyre and Florence Le Gac. Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis
- Sandhya B, Thomas S, Isabel W, Shenbangarathai R. (2006), Ethnomedicinal plants used by Valaiyan of the Piranmalai Hills (Reserved Forest) community, Tamil Nadu, India. A pilot study. Afr. J. Traditional Alter Complement 1, 101-14.
- Shamina Azeez, Senthil Amudhan, M., Sachidananda Adiga., Namita Rao, Nirmala Rao, A Laxminarayana Udupa (2007). Wound Healing profiles of Areca catechu extract differ in wound models in Wistar rats. Kuwait Medical J. 39: 48-52.
- Sa'roni and Adjirni. (2001). Effect of infusion of *Foeniculum vulgare* Mill fruit on white mouse pregnancy and acute toxicity in mice. *Mirror of the World of Medicine*; 133: 57-59.
- Shivasankar S, and Govindarajan, VS (1963). Relative equilibrium Relation of moisture arecanut processed and whole dried food flavor *Sci* 12 (11): 317321.
- Setiawan, I.M. (2007). Pemeriksaan enzyme-linked immunoserbent assay untuk diagnosis leptospirosis. *Ebers Papyrus*. 13: 125—136
- Shyi-Wu, Guey-Shyang WH, Te-Jung C, Wang PS. (2008). Effects of arecoline on testosterone release in rat. *Am J Physiol Endocrinil Metab*. 295:E497E504.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997). "The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology". *Endocr. Rev.* 18 (6): 739–73. doi:10.1210/er.18.6.739. PMID 9408742.

- SM Jeon, HS Kim, TG Lee, SH Ryu, PG Suh, SJ Byun YB, Park, MS Choi (2000). Reduces cholesteryl oleate absorption in mice supplemented with Areca catechu L. *Ann Nutr Metab extract.* 44 (4): 170-6.
- Sinchak K. and Edward J. Wagner, (2012), Estradiol Signaling in the Regulation of Reproduction and Energy Balance, *Front Neuroendocrinol*, 33, 4, 342–363. doi:10.1016/j.yfrne.2012.08.004.
- Sinha, A. and A.R. Rao. (1985). Induction of shape abnormality and unscheduled DNA syntesis by arecoline in the germ cells of mice. *Mutat. Res.* 158:189-192.
- Sjahfirdi L., Pudji Astuti, Putri Krida Gita P, Hera Maheshwari, (2013). Pemeriksaan profil hormon progesteron selama siklus Estrus tikus (*rattus norvegicus*) betina menggunakan perangkat inframerah *Jurnal Kedokteran Hewan.* Vol. 7 No. 1, Maret 2013(ISSN : 1978-225X)
- Sophia, R.A. (2003). Uji Efek Diuretic Suspensi Simplisia Daun Sambiloto (*Andrographis Paniculata* ness) terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Betina Galur Sprague-Dawley. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Jakarta.
- Spornitz, U.M., C.D. Socin, & A.A. Dravid. (1999). Estrous Stage Determination in Rats by Means of Scanning Electron Microscopic Images of Uterine Surface Epithelium. *The Anatomical Record.* 254: 116—126.
- Sumitra Hada, Nobuko Kakiuchi, Masao Hattori, Tsuneo Namba (2006). Identification of the antibacterial principle against *Streptococcus mutans* and the principle of inhibition against glucosyltransferase from the seeds of *Areca catechu* L *Pneumatic Research.* (3) 4: 140 - 144.
- S.Suresh Babu, S Suresh Babu M. Madhavi, M. Madhavi,. (1995). *Green Remedies: Healing Strengths of Herbs*, Published by Pustak Mahal, Pageno. 2005; 55- 56 / JC Kurian, *Healing Plants*, Publishing Oriental Home Watchman, Printed and Published by EB Mathews, 7th Ed, 1-20, Pune.
- S Suresh Babu, S Suresh Babu M. Madhavi, M. Madhavi,. (2005). *Green Remedies: Healing Power of Herbs*, Published by Pustak Mahal, Pageno.; 55- 56/
- Sumarmin, R. (2001). —Uji In Vivo Ekstrak kulit Batang Angsana (*Pterocarpus indicus* W.) terhadap Fertilitas Mencit Betina (*Mus musculus* L.)

- Susila, Y. (2003). Perubahan histologis testis akibat pemberian serbuk pinang sirih (*Areca catechu*) pada ayam. Darussalam Banda Aceh. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala
- Syadida, F., S.S. Karyono, dan H.M. Mahdi. (2005). Penggunaan dekok biji pinang (*Areca catechu*) sebagai miotikum pada mata kelinci (*Lepus sp.*). *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. XXI(3):7-13.
- Syahrur, M.H. (1994). Reproduksi dan Embriologi : Dari Satu Sel menjadi Organisme. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.
- Thackray VG., (2014). Fox Tales: Regulation of Gonadotropin Gene Expression by Forkhead Transcription Factors. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 March 25; 385(0): 62–70. (doi:10.1016/j.mce.2013.09.034.)
- Toelihere, M.R. (1979). Fisiologi Reproduksi Pada Ternak . Bandung: Penerbit Angkasa.
- Turner, C.D. dan Bagnara, J.T. (1976). Endokrinologi Umum (terjemahan Harjoso). Yogyakarta: Penerbit Airlangga Universitas.
- United Nations Population Division (UNDP). (2000). World population prospects: The 2000 revision. New York, United Nations.
- Walker W.H and Cheng Jing. review: FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Department of Cell Biology and Physiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA
- Wang CK, Lee WH, Peng CH. (1997). Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. *J Agric Food Chem*. 45:1185-1188.
- Wang, C.K., and Lee, W.H., (1996), Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2014-2019.
- Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. (1996), Pharmacological methods in phytotherapy research. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. John Wiley and Sons, London 1, 191-212.
- Williams S. Malik A. Chowdhury S. Chauhan S. (2002). Socio-cultural aspects of using areca nut. *Addict Biol*; 7: 147-154.
- Williams S. Malik A. Chowdhury S. Chauhan S. (1963). Sociocultural aspects of areca Shivasankar S, and Govindarajan, VS: Equilibrium relative humidity relationship of processed arecanut and whole dried arecanut. *Food Sci* 12(11):317-321.

- VK Jaiswal Preetee, Singh, DK Singh (2008). Enzyme inhibition by molluscicidal component of *Areca catechu* and *Carica papaya* in the nervous tissue of vector snail *Lymnaea acuminata*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92 (3), 164-168
- Yang MJ, Chung TC, Yang MC, Hsu TY, Ko YC. (2001). Betel nut chewing and risk of adverse birth outcomes among aborigines in Eastern Taiwan. *J. Toxicol. Environ Health* 64:465-472
- YB Park, SM Jeon, SJ Byun, HS Kim and MS Choi, (2002). Free intestinal cholesterol absorption is lowered by supplementation of *Areca catechu* L. extract in rats. *Life Sci.* 2002 Mar 8; 70 (16): 1849-59.

HASIL ELISA KADAR ESTRADIOL

No	No Sampel	Konsentrasi (pg/ml)
1	1.D	658,300
2	2.D	592,447
3	3.D	645,129
4	4.D	592,173
5	5.D	645,404
6	11.D	394,890
7	12.D	329,587
8	13.D	263,460
9	14.D	329,312
10	15.D	329,861
11	21.D	164,407
12	22.D	65,903
13	23.D	164,681
14	24.D	66,177
15	25.D	131,206
16	11.B	657,751
17	12.B	593,270
18	13.B	644,580
19	14.B	592,722
20	15.B	645,952

HASIL ELISA KADAR FSH

No	No Sampel	Konsentrasi (ng/ml)
1	1.D	52,952
2	2.D	47,221
3	3.D	51,875
4	4.D	47,458
5	5.D	51,789
6	11.D	31,559
7	12.D	26,302
8	13.D	20,959
9	14.D	26,108
10	15.D	26,259
11	21.D	13,311
12	22.D	5,319
13	23.D	13,053
14	24.D	5,469
15	25.D	10,403
16	11.B	52,392
17	12.B	47,308
18	13.B	51,724
19	14.B	47,329
20	15.B	51,767

HASIL ELISA KADAR LH

No	No Sampel	Konsentrasi (ng/ml)
1	1.D	17,955
2	2.D	16,002
3	3.D	17,666
4	4.D	15,957
5	5.D	17,496
6	11.D	10,646
7	12.D	8,848
8	13.D	6,947
9	14.D	8,648
10	15.D	8,693
11	21.D	4,335
12	22.D	1,598
13	23.D	4,180
14	24.D	1,554
15	25.D	3,292
16	11.B	17,666
17	12.B	16,002
18	13.B	17,511
19	14.B	16,054
20	15.B	17,444

Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Template	Log Template	Slope (dR)
Unkn-07	Standard	228,025	228,025	0,0650	2,1048E+01	1,30169	1,9948E+01	0,0650648	50,5000000	1,6989002	-3,357,357
Unkn-07	Standard	228,107	228,025	0,0650	1,9995E+01	1,29874	1,9948E+01	0,0650648	50,5000000	1,6989002	-3,357,357
Unkn-07	Standard	228,073	228,025	0,0650	1,9966E+01	1,30063	1,9948E+01	0,0650648	50,5000000	1,6989002	-3,357,357
Unkn-08	13C	228,207	228,200	0,1426	1,9885E+01	1,29671	1,9850E+01	0,0415821	179,5900000	1,6987080	-3,357,357
Unkn-08	13C	227,386	228,200	0,1426	1,9515E+01	1,29480	1,9850E+01	0,0415821	179,5900000	1,6987080	-3,357,357
Unkn-08	13C	227,988	228,200	0,1426	2,1066E+01	1,30077	1,9850E+01	0,0415821	179,5900000	1,6987080	-3,357,357
Unkn-09	24C	229,482	229,291	0,1228	1,8759E+01	1,28829	1,8759E+01	0,1724826	69,5290000	1,6974039	-3,357,357
Unkn-09	24C	229,285	229,291	0,1228	1,8375E+01	1,2735	1,8759E+01	0,1724826	69,5290000	1,6974039	-3,357,357
Unkn-09	24C	229,07	229,291	0,1228	1,8995E+01	1,2764	1,8759E+01	0,1724826	69,5290000	1,6974039	-3,357,357
Unkn-03	Standard	229,888	229,464	0,0235	1,9555E+01	1,2828	1,9555E+01	0,2808892	85,6420000	1,7087088	-3,357,357
Unkn-03	Standard	229,64	229,464	0,0235	1,9955E+01	1,2980	1,9555E+01	0,2808892	85,6420000	1,7087088	-3,357,357
Unkn-03	Standard	229,554	229,464	0,0235	1,9555E+01	1,2829	1,9555E+01	0,2808892	85,6420000	1,7087088	-3,357,357
Unkn-020	Standard	228,735	228,042	0,2241	1,8475E+01	1,2626	1,8049E+01	0,0627440	825,5000000	1,3979406	-3,357,357
Unkn-020	Standard	227,287	228,042	0,2241	1,7855E+01	1,2580	1,8049E+01	0,0627440	825,5000000	1,3979406	-3,357,357
Unkn-020	Standard	228,185	228,042	0,2241	1,7855E+01	1,2512	1,8049E+01	0,0627440	825,5000000	1,3979406	-3,357,357
Unkn-94	21C	230,975	230,088	0,1158	1,9255E+01	1,2888	1,9023E+01	0,1015325	624,5700000	1,70870814	-3,357,357
Unkn-94	21C	230,174	230,088	0,1158	1,8255E+01	1,2788	1,9023E+01	0,1015325	624,5700000	1,70870814	-3,357,357
Unkn-94	21C	230,354	230,088	0,1158	1,9255E+01	1,2886	1,9023E+01	0,1015325	624,5700000	1,70870814	-3,357,357
Unkn-92	22C	232,807	232,480	0,3892	1,9155E+01	1,2839	1,9559E+01	0,3893269	535,5520000	1,70901727	-3,357,357
Unkn-92	22C	231,188	232,480	0,3892	1,9855E+01	1,2942	1,9559E+01	0,3893269	535,5520000	1,70901727	-3,357,357
Unkn-92	22C	232,364	232,480	0,3892	1,9685E+01	1,2932	1,9559E+01	0,3893269	535,5520000	1,70901727	-3,357,357
Unkn-06	Standard	271,28	271,235	0,0789	1,5755E+01	1,1989	1,5755E+01	0,0768857	79,8172000	1,6873885	-3,357,357
Unkn-06	Standard	271,246	271,235	0,0789	1,5755E+01	1,1962	1,5755E+01	0,0768857	79,8172000	1,6873885	-3,357,357
Unkn-06	Standard	271,180	271,235	0,0789	1,5755E+01	1,1988	1,5755E+01	0,0768857	79,8172000	1,6873885	-3,357,357
Unkn-03	Standard	26,89	27,05	0,1240	1,6265E+01	1,2079	1,6021E+01	0,1024068	94,2500000	1,09691	-3,357,357
Std-03	Standard	27,17	27,05	0,107	1,58E+01	1,199	1,60E+01	0,1069268	12,50000	1,09691	-3,357
Std-03	Standard	26,98	27,05	0,107	1,60E+01	1,205	1,60E+01	0,1069268	12,50000	1,09691	-3,357

Unkn-13	23.C	30,98	30,86	0,240	1,20E+01	1,080	1,21E+01	0,2400694	51,11200	1,70852	-3,357
Unkn-13	23.C	30,58	30,86	0,240	1,24E+01	1,094	1,21E+01	0,2400694	51,11200	1,70852	-3,357
Unkn-14	24.C	31,09	31,18	0,121	1,19E+01	1,076	1,18E+01	0,1209683	51,06700	1,70814	-3,357
Unkn-14	24.C	31,14	31,18	0,121	1,19E+01	1,074	1,18E+01	0,1209683	51,06700	1,70814	-3,357
Unkn-14	24.C	31,32	31,18	0,121	1,17E+01	1,067	1,18E+01	0,1209683	51,06700	1,70814	-3,357
Unkn-15	25.C	30,79	30,76	0,128	1,22E+01	1,087	1,22E+01	0,1276715	51,05500	1,70804	-3,357
Unkn-15	25.C	30,62	30,76	0,128	1,24E+01	1,093	1,22E+01	0,1276715	51,05500	1,70804	-3,357
Unkn-15	25.C	30,87	30,76	0,128	1,21E+01	1,084	1,22E+01	0,1276715	51,05500	1,70804	-3,357
Std-06	Standard	33,50	33,46	0,093	9,50E+00	0,978	9,54E+00	0,0929157	1,56200	0,19368	-3,357
Std-06	Standard	33,35	33,46	0,093	9,65E+00	0,985	9,54E+00	0,0929157	1,56200	0,19368	-3,357
Std-06	Standard	33,52	33,46	0,093	9,48E+00	0,977	9,54E+00	0,0929157	1,56200	0,19368	-3,357
Unkn-16	11.A	23,13	23,18	0,127	1,99E+01	1,298	1,98E+01	0,1266228	51,03600	1,70788	-3,357
Unkn-16	11.A	23,32	23,18	0,127	1,97E+01	1,294	1,98E+01	0,1266228	51,03600	1,70788	-3,357
Unkn-16	11.A	23,08	23,18	0,127	1,99E+01	1,299	1,98E+01	0,1266228	51,03600	1,70788	-3,357
Unkn-17	12.A	24,18	24,12	0,060	1,88E+01	1,275	1,89E+01	0,0602771	50,40300	1,70246	-3,357
Unkn-17	12.A	24,06	24,12	0,060	1,89E+01	1,277	1,89E+01	0,0602771	50,40300	1,70246	-3,357
Unkn-17	12.A	24,13	24,12	0,060	1,89E+01	1,276	1,89E+01	0,0602771	50,40300	1,70246	-3,357
Unkn-18	13.A	23,45	23,42	0,256	1,96E+01	1,291	1,96E+01	0,2563201	50,84000	1,70621	-3,357
Unkn-18	13.A	23,15	23,42	0,256	1,99E+01	1,298	1,96E+01	0,2563201	50,84000	1,70621	-3,357
Unkn-18	13.A	23,66	23,42	0,256	1,93E+01	1,286	1,96E+01	0,2563201	50,84000	1,70621	-3,357
Neg	Neg	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-3,357
Neg	Neg	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-3,357
Neg	Neg	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-3,357
Unkn-19	14.A	24,18	24,15	0,093	1,88E+01	1,275	1,88E+01	0,0929157	50,39400	1,70238	-3,357
Unkn-19	14.A	24,23	24,15	0,093	1,88E+01	1,273	1,88E+01	0,0929157	50,39400	1,70238	-3,357
Unkn-19	14.A	24,05	24,15	0,093	1,90E+01	1,278	1,88E+01	0,0929157	50,39400	1,70238	-3,357
Unkn-20	15.A	23,63	23,66	0,112	1,94E+01	1,287	1,93E+01	0,1123981	50,13100	1,70011	-3,357
Unkn-20	15.A	23,78	23,66	0,112	1,92E+01	1,284	1,93E+01	0,1123981	50,13100	1,70011	-3,357
Unkn-20	15.A	23,56	23,66	0,112	1,94E+01	1,289	1,93E+01	0,1123981	50,13100	1,70011	-3,357

T
-
T
E
S
T

G
R
O
U
P
S
=
k
e
l
o
m
p
o
k
(
1

2
)

/
M
I
S

```

SING=ANALYSIS
/VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
/CRITERIA=CI (.95) .

```

T-Test

Notes

Output Created		09-JAN-2017 23:21:34
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETT
	Active Dataset	Y.sav DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST GROUPS=kelompok(1 2) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).
	Processor Time	
	Elapsed Time	

Resources	00:00:00.02
	00:00:00.02

[DataSet1] C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY.sav

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	kontrol	5	13.5920	.44278	.19802
	kelompok 1 post	5	9.1311	.66147	.29582
E2pgpermL	kontrol	5	626.6904587	31.83300919	14.23615449
	kelompok 1 post	5	329.4219971	46.46858203	20.78138165
FSHngpermL	kontrol	5	50.2590105	2.70527113	1.20983403
	kelompok 1 post	5	26.2376633	3.74825132	1.67626895
LHngpermL	konrtol	5	17.0153015	.95970409	.42919272
	kelompok 1 post	5	8.7562910	1.31038428	.58602166

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	.054	.822	12.531	8	.000	4.46088	.35598	3.64000	5.28177
	Equal variances not assumed			12.531	6.985	.000	4.46088	.35598	3.61877	5.30299
E2pgpermL	Equal variances assumed	.004	.949	11.801	8	.000	297.26846 162	25.18995669	239.1803173 3	355.35660591
	Equal variances not assumed			11.801	7.077	.000	297.26846 162	25.18995669	237.8343050 4	356.70261820
FSHngpermL	Equal variances assumed	.017	.899	11.620	8	.000	24.021347 15	2.06726292	19.25423032	28.78846398
	Equal variances not assumed			11.620	7.278	.000	24.021347 15	2.06726292	19.17062603	28.87206827
LHngpermL	Equal variances assumed	.007	.937	11.370	8	.000	8.2590105 0	.72637991	6.58397542	9.93404558

Equal variances not assumed			11.370	7.332	.000	8.2590105 0	.72637991	6.55705152	9.96096948
--------------------------------	--	--	--------	-------	------	----------------	-----------	------------	------------

```
T-TEST GROUPS=kelompok(1 3)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
/CRITERIA=CI(.95).
```

T-Test

		Notes
Output Created		09-JAN-2017 23:22:08
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15

Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST GROUPS=kelompok(1 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).
Resources	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.02

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	kontrol	5	13.5920	.44278	.19802
	kelompok 2 post	5	6.1515	.58032	.25953
E2pgpermL	kontrol	5	626.6904587	31.83300919	14.23615449
	kelompok 2 post	5	118.4749846	49.76382193	22.25505773
FSHngpermL	kontrol	5	50.2590105	2.70527113	1.20983403
	kelompok 2 post	5	9.5110499	3.92725972	1.75632394
LHngpermL	kontrol	5	17.0153015	.95970409	.42919272
	kelompok 2 post	5	2.9918508	1.35254693	.60487738

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	.104	.755	22.793	8	.000	7.44051	.32645	6.68773	8.19329
	Equal variances not assumed			22.793	7.478	.000	7.44051	.32645	6.67849	8.20253
E2pgpermL	Equal variances assumed	3.027	.120	19.237	8	.000	508.215474 07	26.41885102	447.29349437	569.1374537 8
	Equal variances not assumed			19.237	6.804	.000	508.215474 07	26.41885102	445.37822856	571.0527195 9
FSHngpermL	Equal variances assumed	1.942	.201	19.106	8	.000	40.7479605 4	2.13269129	35.82996560	45.66595548
	Equal variances not assumed			19.106	7.098	.000	40.7479605 4	2.13269129	35.71908725	45.77683383

LHngpermL	Equal variances assumed	1.605	.241	18.908	8	.000	14.0234506 4	.74167582	12.31314313	15.73375816
	Equal variances not assumed			18.908	7.213	.000	14.0234506 4	.74167582	12.28012163	15.76677966

```
T-TEST GROUPS=kelompok(2 3)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
/CRITERIA=CI(.95).
```

T-Test

Notes

Output Created	09-JAN-2017 23:22:35	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY. sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15

Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
Syntax	Cases Used	<p>Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.</p> <p>T-TEST GROUPS=kelompok(2 3) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).</p>
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	kelompok 1 post	5	9.1311	.66147	.29582
	kelompok 2 post	5	6.1515	.58032	.25953
E2pgpermL	kelompok 1 post	5	329.4219971	46.46858203	20.78138165
	kelompok 2 post	5	118.4749846	49.76382193	22.25505773
FSHngpermL	kelompok 1 post	5	26.2376633	3.74825132	1.67626895

	kelompok 2 post	5	9.5110499	3.92725972	1.75632394
LHngpermL	kelompok 1 post	5	8.7562910	1.31038428	.58602166
	kelompok 2 post	5	2.9918508	1.35254693	.60487738

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	.000	.991	7.572	8	.000	2.97963	.39353	2.07215	3.88710
	Equal variances not assumed			7.572	7.867	.000	2.97963	.39353	2.06947	3.88978
E2pgpermL	Equal variances assumed	.770	.406	6.928	8	.000	210.9470124 5	30.44919404	140.731045 08	281.16297983

	Equal variances not assumed			6.928	7.963	.000	210.9470124 5	30.44919404	140.673814 36	281.22021054
FSHngpermL	Equal variances assumed	.635	.449	6.889	8	.000	16.72661339	2.42786972	11.1279357 8	22.32529100
	Equal variances not assumed			6.889	7.983	.000	16.72661339	2.42786972	11.1258171 4	22.32740964
LHngpermL	Equal variances assumed	.500	.499	6.845	8	.000	5.76444015	.84219833	3.82232731	7.70655298
	Equal variances not assumed			6.845	7.992	.000	5.76444015	.84219833	3.82198844	7.70689185

ONEWAY progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL BY kelompok
/MISSING ANALYSIS.

PENGARUH PERLAKUAN TERHADAP HORMON

Notes

Output Created		09-JAN-2017 23:25:01
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY. sav
	Active Dataset	DataSet1

	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File	15
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
Syntax	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis. ONEWAY progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL BY kelompok /MISSING ANALYSIS.
	Resources	
	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.02

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
progesteron	Between Groups	140.231	2	70.116	216.769	.000
	Within Groups	3.881	12	.323		
	Total	144.113	14			

E2pgpermL	Between Groups	651916.914	2	325958.457	173.103	.000
	Within Groups	22596.430	12	1883.036		
	Total	674513.344	14			
FSHngpermL	Between Groups	4195.335	2	2097.668	171.046	.000
	Within Groups	147.165	12	12.264		
	Total	4342.500	14			
LHngpermL	Between Groups	496.829	2	248.414	166.813	.000
	Within Groups	17.870	12	1.489		
	Total	514.699	14			

```
T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(1 2)
  /MISSING=ANALYSIS
  /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
  /CRITERIA=CI (.95) .
```

T-Test

Notes

Output Created	09-JAN-2017 23:29:12	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
Missing Value Handling	N of Rows in Working Data File	15
	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.

Syntax	T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(1 2) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

Group Statistics

	statusESTRUSakhir	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	Normal	5	13.5920	.44278	.19802
	Memanjang	7	7.9568	1.56754	.59248
E2pgpermL	Normal	5	626.6904587	31.83300919	14.23615449
	Memanjang	7	239.8628076	121.31799935	45.85389369
FSHngpermL	Normal	5	50.2590105	2.70527113	1.20983403
	Memanjang	7	19.1589832	9.61413135	3.63380009
LHngpermL	Normal	5	17.0153015	.95970409	.42919272
	Memanjang	7	6.3242857	3.33517779	1.26057872

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	12.195	.006	7.723	10	.000	5.63525	.72964	4.00953	7.26098
	Equal variances not assumed			9.021	7.279	.000	5.63525	.62469	4.16950	7.10101
E2pgpermL	Equal variances assumed							56.2733239		
		10.558	.009	6.874	10	.000	386.82765109	1	261.44287176	512.21243043
	Equal variances not assumed							48.0129947		
				8.057	7.113	.000	386.82765109	1	273.66049601	499.99480617
FSHngpermL	Equal variances assumed	9.719	.011	6.951	10	.000	31.10002728	4.47416622	21.13096370	41.06909087

	Equal variances not assumed			8.120	7.270	.000	31.10002728	3.82990881	22.11144958	40.08860498
LHngpermL	Equal variances assumed	9.265	.012	6.880	10	.000	10.69101579	1.55388464	7.22874505	14.15328653
	Equal variances not assumed			8.028	7.324	.000	10.69101579	1.33164000	7.57021174	13.81181983

```
T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(1 0)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
/CRITERIA=CI(.95).
```

T-Test

Output Created	09-JAN-2017 23:29:57	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.

Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax	T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(1 0) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).
Resources	
Processor Time	00:00:00.02
Elapsed Time	00:00:00.02

Group Statistics

	statusESTRUSakhir	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	Normal	5	13.5920	.44278	.19802
	Tidakestrus	3	6.9053	2.02827	1.17102
E2pgpermL	Normal	5	626.6904587	31.83300919	14.23615449
	Tidakestrus	3	186.8150851	133.36379550	76.99762323
FSHngpermL	Normal	5	50.2590105	2.70527113	1.20983403
	Tidakestrus	3	14.8768946	10.58878400	6.11343729

LHngpermL	Normal	5	17.0153015	.95970409	.42919272
	tidakestrus	3	4.8235697	3.59081531	2.07315819

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	8.276	.028	7.471	6	.000	6.68673	.89502	4.49669	8.87677
	Equal variances not assumed			5.630	2.115	.027	6.68673	1.18765	1.83424	11.53922
E2pgpermL	Equal variances assumed	6.052	.049	7.412	6	.000	439.87537361	59.34843687	294.65498007	585.09576714
	Equal variances not assumed			5.618	2.138	.026	439.87537361	78.30263136	122.94851782	756.80222939
FSHngpermL	Equal variances assumed	5.801	.053	7.453	6	.000	35.38211582	4.74710354	23.76637190	46.99785974
	Equal variances not assumed			5.677	2.158	.025	35.38211582	6.23199919	10.36485319	60.39937845
LHngpermL	Equal variances assumed	5.672	.055	7.532	6	.000	12.19173173	1.61856004	8.23125797	16.15220548

Equal variances not assumed							2.1171186		
		5.759	2.173	.024	12.19173173		2	3.74374681	20.63971664

```
T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(2 0)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL
/CRITERIA=CI(.95).
```

T-Test

Notes

Output Created	09-JAN-2017 23:30:39	
Comments		
Input	Data	C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY.
		sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	kelompok<= 3 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.

Syntax	T-TEST GROUPS=statusESTRUSakhir(2 0) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL /CRITERIA=CI(.95).	
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

Group Statistics

	statusESTRUSakhir	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
progesteron	memanjang	7	7.9568	1.56754	.59248
	tidakestrus	3	6.9053	2.02827	1.17102
E2pgpermL	memanjang	7	239.8628076	121.31799935	45.85389369
	tidakestrus	3	186.8150851	133.36379550	76.99762323
FSHngpermL	memanjang	7	19.1589832	9.61413135	3.63380009
	tidakestrus	3	14.8768946	10.58878400	6.11343729
LHngpermL	memanjang	7	6.3242857	3.33517779	1.26057872
	tidakestrus	3	4.8235697	3.59081531	2.07315819

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	Df	Sig. (2tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
progesteron	Equal variances assumed	.096	.765	.899	8	.395	1.05148	1.16932	-1.64499	3.74794
	Equal variances not assumed			.801	3.088	.480	1.05148	1.31237	-3.05888	5.16183
E2pgpermL	Equal variances assumed	.034	.859	.618	8	.554	53.04772251	85.87093918	-144.97101834	251.06646337
	Equal variances not assumed			.592	3.522	.590	53.04772251	89.61703828	-209.65385278	315.74929781
FSHngpermL	Equal variances	.028	.872	.629	8	.547	4.28208853	6.80875584	-11.41893060	19.98310767

	assumed Equal variances not assumed			.602	3.517	.584	4.28208853	7.11186464	-16.58167123	25.14584 830
LHngpermL	Equal variances assumed	.045	.837	.639	8	.540	1.50071594	2.34683645	-3.91109863	6.912530 51
	Equal variances not assumed			.619	3.589	.573	1.50071594	2.42632305	-5.55148183	8.552913 71

ONEWAY progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL BY statusESTRUSakhir
/MISSING ANALYSIS.

PENGARUH HORMON TERHADAP ESTRUS

Notes

Output Created	09-JAN-2017 23:31:43
Comments	
Input	Data C:\Users\ASUS\Documents\ESTRUSTETTY. sav
Active Dataset	DataSet1
Filter	kelompok <= 3 (FILTER)

	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY progesteron E2pgpermL FSHngpermLLHngpermL BY statusESTRUSakhir /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00.00
	Elapsed Time	00:00:00.00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
progesteron	Between Groups	120.358	2	60.179	30.400	.000
	Within Groups	23.755	12	1.980		
	Total	144.113	14			
E2pgpermL	Between Groups	546579.837	2	273289.918	25.634	.000

	Within Groups	127933.508	12	10661.126		
	Total	674513.344	14			
FSHngpermL	Between Groups	3534.392	2	1767.196	26.242	.000
	Within Groups	808.108	12	67.342		
	Total	4342.500	14			
LHngpermL	Between Groups	418.486	2	209.243	26.098	.000
	Within Groups	96.213	12	8.018		
	Total	514.699	14			

HASIL PENGAMATAN MIKROSKOPIS (SIKLUS ESTRUS)

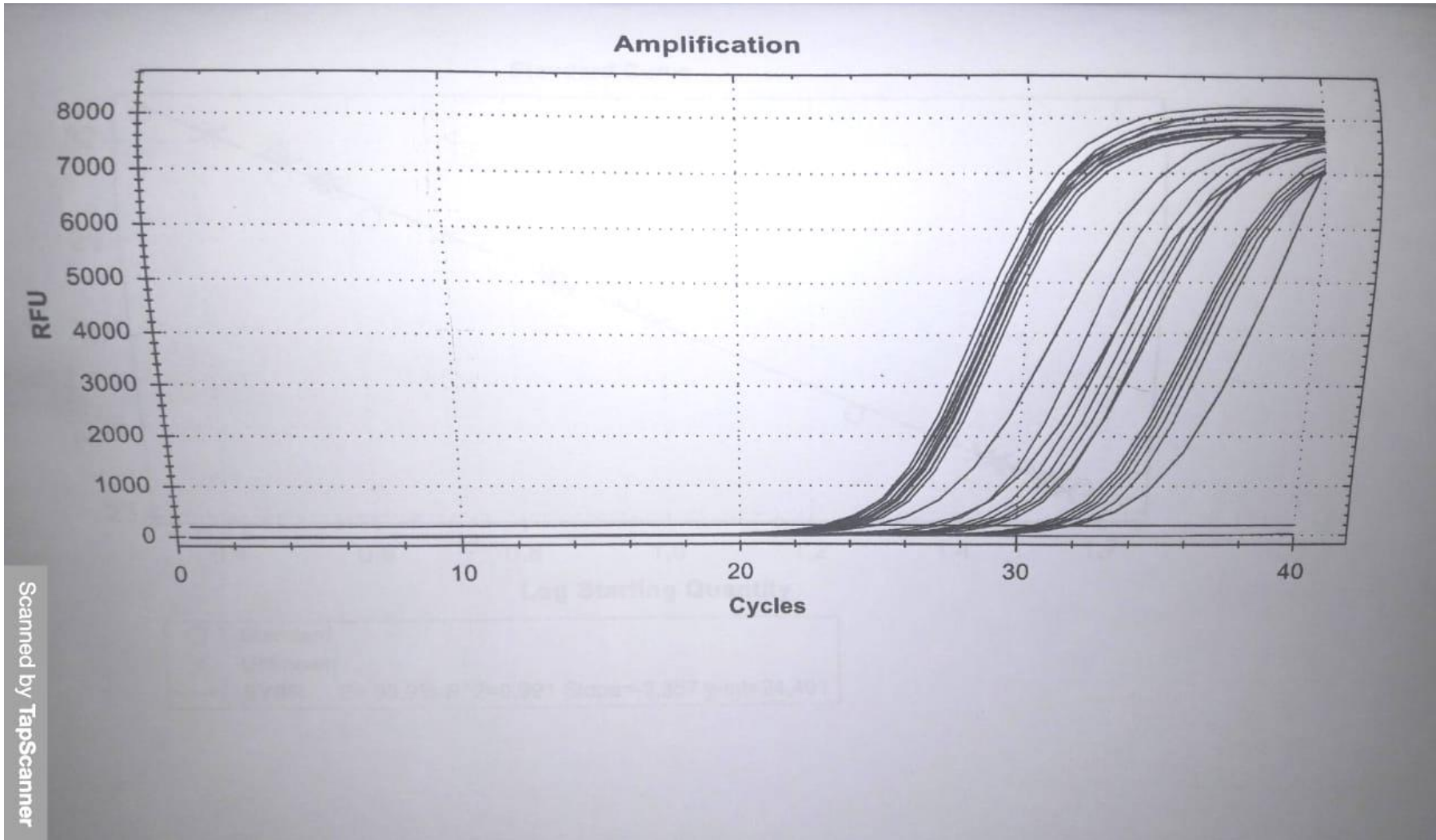
SIKLUS ESTRUS SETELAH PERLAKUAN

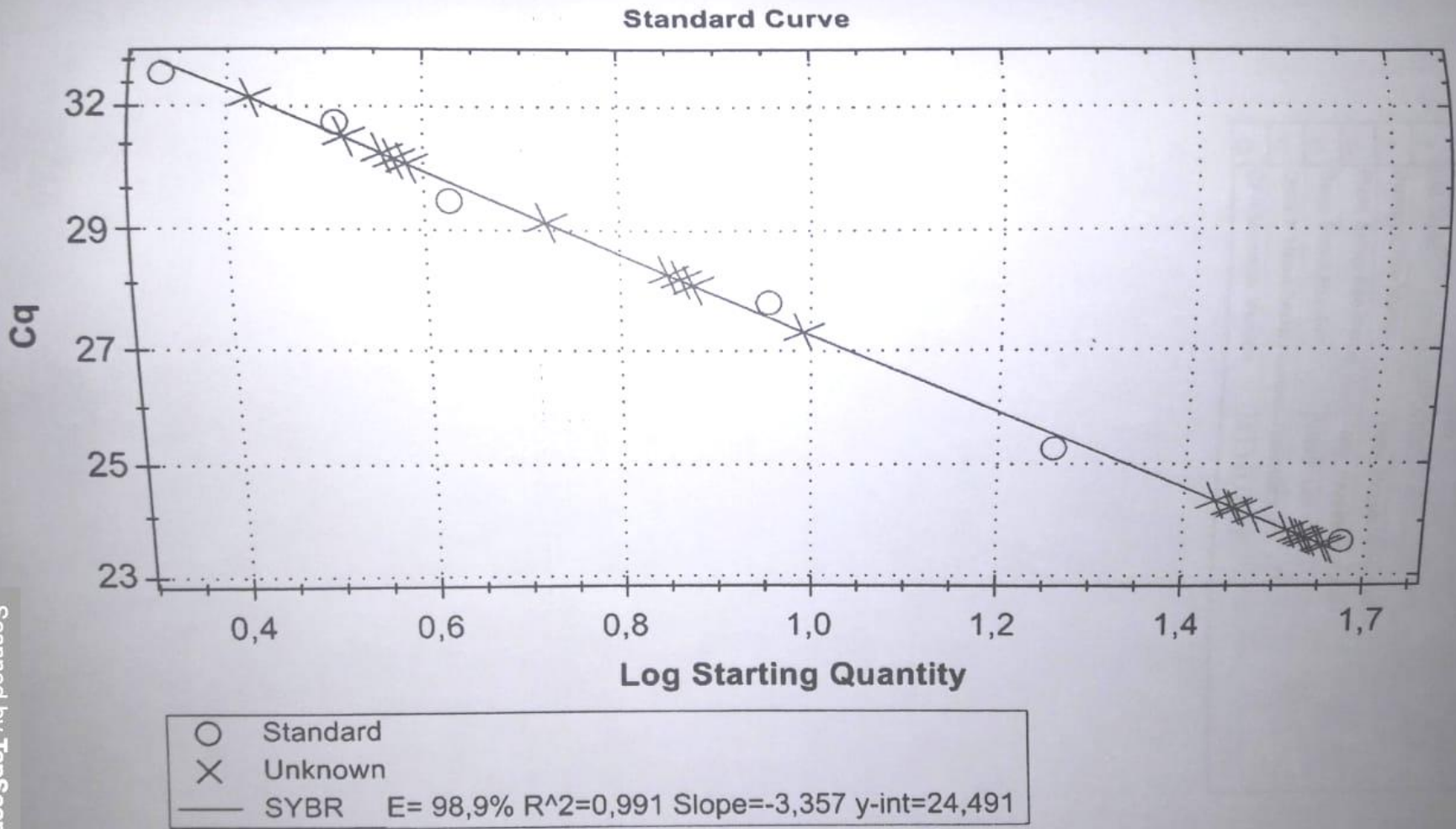
SIKLUS ESTRUS SEBELUM PERLAKUAN (PRE)

(POST)

KLP	HARI					
	NO	1	2	3	4	5
I	01.	D	P	E	M	D
	02.	E	M	D	D	P
	03.	E	M	D	D	P
	04.	P	E	M	D	D
	05.	P	E	M	D	
II	11.	E	M	D	P	
	12.	D	D	P	E	M
	13.	P	E	M	D	D
	14.	M	D	D	P	E
	15.	D	P	E	M	
III	21.	M	D	D	P	E
	22.	E	D	M	P	
	23.	P	E	M	D	
	24.	M	D	D	P	E
	25.	E	M	D	P	

KLP	HARI															
	NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I	01.	D	D	D	P	E	E	D								
	02.	D	D	D	P	E										
	03.	P	P	E	E	E	M	D	M	D	D					
	04.	D	D	D	P	P	E	E	M							
	05.	D	D	D	D	P	E	E	M	M						
II	11.	D	D	D	D	D	D	P	E	M						
	12.	M	D	D	P	E	M									
	13.	D	D	D	P	E	M									
	14.	D	D	D	D	D	D	D	M	D	D	D	P	E	M	
	15.	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	P	D	M	D
III	21.	D	D	D	D	P	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	22.	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	p	P	D	D	P
	23.	D	D	D	D	D	D	D	D	P	D	P	D	P	D	D
	24.	D	D	D	D	D	D	D	D	P	P	E	M			
	25.	D	D	D	D	P	D	D	D	P	D	P	P	D	D	D





	A	B
1	File Name	admin_2017-03-17 12:35:44_BR004129.pcrd
2	Created By User	Romi
3	Notes	
4	ID	
5	Run Started	03/17/2017 12:46:37 UTC
6	Run Ended	03/17/2017 14:25:05 UTC
7	Sample Vol	25
8	Lid Temp	105
9	Protocol File Name	Tetty_Progesteron.prcl
10	Plate Setup File Name	Tetty_Progesteron.prcl
11	Base Serial Number	BR004129
12	Optical Head Serial Number	788BR04138
13	CFX Manager Version	3.1.1517.0823.

Scanned by TapScanner

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN



Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
RSPTN Universitas Hasanuddin

RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar

Sekretariat : Lantai 2 Gedung Laboratorium Terpadu FKUH

JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245

Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD,SpGK Telp. 081241850858, Fax : 0411-581431

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK

Nomor : 1625 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2016

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, RSPTN UH, RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo setelah melalui pembahasan dan penilaian, memutuskan penelitian berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Pinang (Areacatechu L.) Terhadap Ekspresi mRNA Gen Reseptor FSH, LH dan Lama Siklus Estrus Mencit BABL/C Betina

dengan Peneliti Utama: **Tetty Rina A, SST, M.Keb**

No. Register

U	H	1	6	0	1	0	0	3	5
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Yang diterima pada tanggal : **8 Januari 2016**

Perbaikan diterima pada tanggal : **7 Desember 2016**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Dan Immunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

Persetujuan Etik ini berlaku satu tahun sejak tanggal ditetapkan. Laporan perkembangan penelitian diserahkan kepada KEPK FKUH, RSPTN UH dan RSWS Makassar setiap ~~tiga bulan/enam bulan~~/satu tahun.

Pada akhir penelitian, **laporan akhir penelitian** harus diserahkan kepada KEPK FKUH, RSPTN UH dan RSWS Makasar paling lambat **30 Desember 2017** . Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 30 Desember 2016

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas

Ketua

Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK

NIP 19600504 1986 01 2 002



Sekretaris

dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK

NIP 19700821 1999 03 1 001



PEMERINTAH KOTA MALANG
DINAS PERTANIAN DAN KETAHANAN PANGAN
Jl. Jenderal Achmad Yani Utara No. 202 Telp.(0341) 491914 / Faks. (0341) 408273
MALANG Kode Pos 65126

Nomor : 524/03/35.73.309/2016
Sifat : Penting
Lampiran : -
Perihal : Ijin Pengeluaran Hewan

Malang, 06 Januari 2017
Kepada:
Yth. Sdr. Dhanny Kurniawan
Perumahan Omah View No. 33
Kel. Cemorokandang, Kec.
Kedungkandang
Kota Malang
Di
MALANG

Berdasarkan Permohonan yang bersangkutan tanggal 06 Januari 2017 dengan ini disampaikan dengan hormat bahwa telah diperiksa oleh Dokter Hewan Dinas Pertanian Kota Malang 25 (dua puluh lima) ekor Tikus Balb-C milik Sdr. Dhanny Kurniawan yang beralamat di Perumahan Omah View No. 33 Kel. Cemorokandang, Kec. Kedungkandang Kota Malang pada saat pemeriksaan dinyatakan sehat. Selanjutnya Tikus Putih dimaksud akan dibawa ke Makassar, Sulawesi Selatan dengan alat transportasi pesawat udara. Pada prinsipnya kami memberi ijin untuk dibawa ke tempat tersebut.

Demikian untuk menjadikan maklum dan dipergunakan seperlunya

a.n. KEPALA DINAS PERTANIAN
KOTA MALANG
Kepala Bidang Peternakan dan
Kesehatan Hewan

Drh. ANTON PRAMUJONO
Pembina¹
NIP. 19691002 199703 1 007

Tembusan :
Yth. 1. Sdr. Kepala Balai Karantina Hewan
Bandara Juanda Surabaya

Scanned by TapScanner



SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ma'mun. S. Si
N I P : 1953.03271976031003
Jabatan : Manager Teknis
Instansi : Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Menerangkan bahwa :

Nama : Tetty Rina Aritonang S.
Mahasiswa : S3 FK. Biomolekuler
Universitas : Universitas Hasanudin Makasar

adalah benar – benar melakukan ekstraksi Buah Pinang di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Demikian surat keterangan yang dapat kami berikan, semoga dapat dipergunakan dengan semestinya.

Bogor, 7 April 2017

Manajer Teknis


Ma'mun S.Si



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)



Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id

Cibinong, 19 Februari 2018

Nomor : 277/1PH.1.01/1f.07/II/2018
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Tetty Rina A**
STIKES Medistra Indonesia

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Buah Pinang	<i>Areca Catechu L.</i>	Arecaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

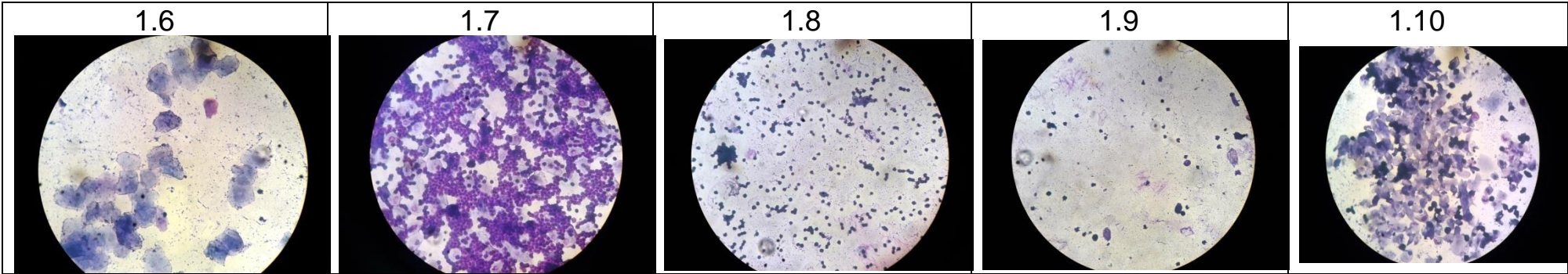
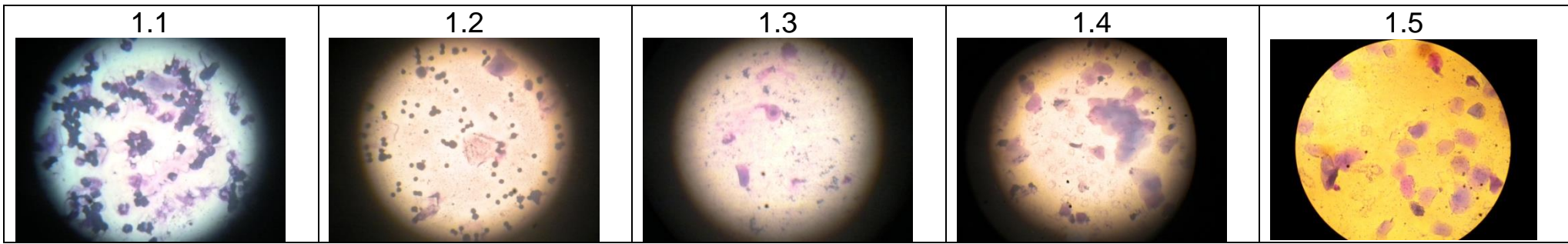


Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setiyo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

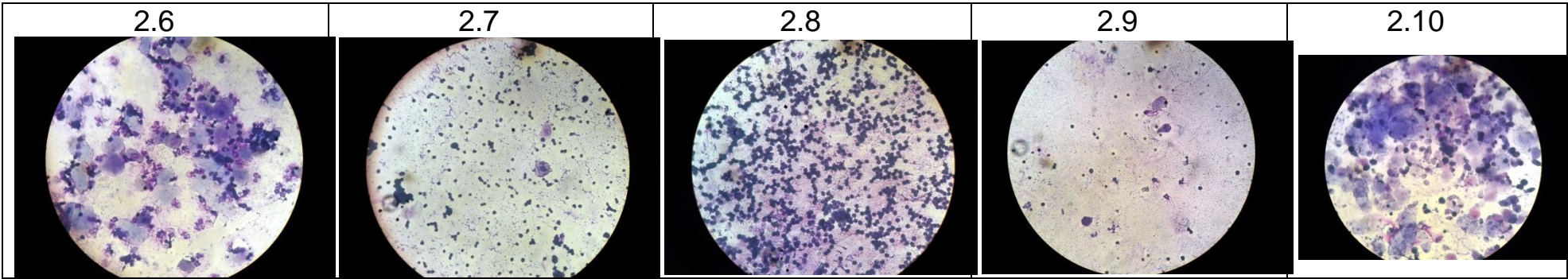
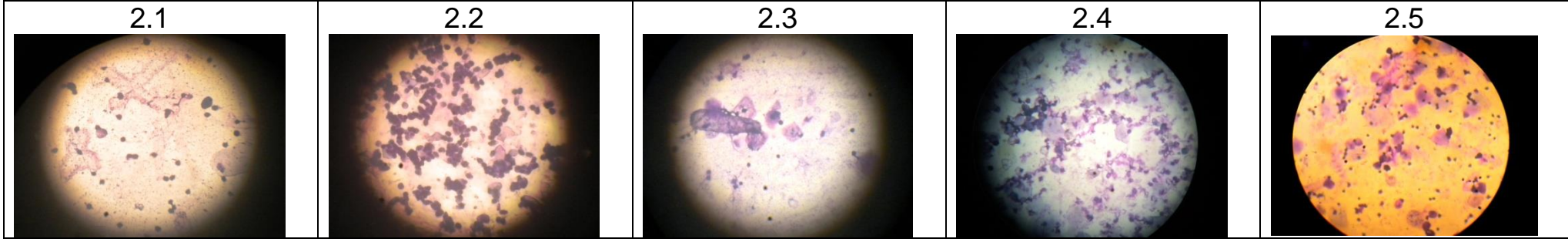
Page 1 of 1

KLP I-01

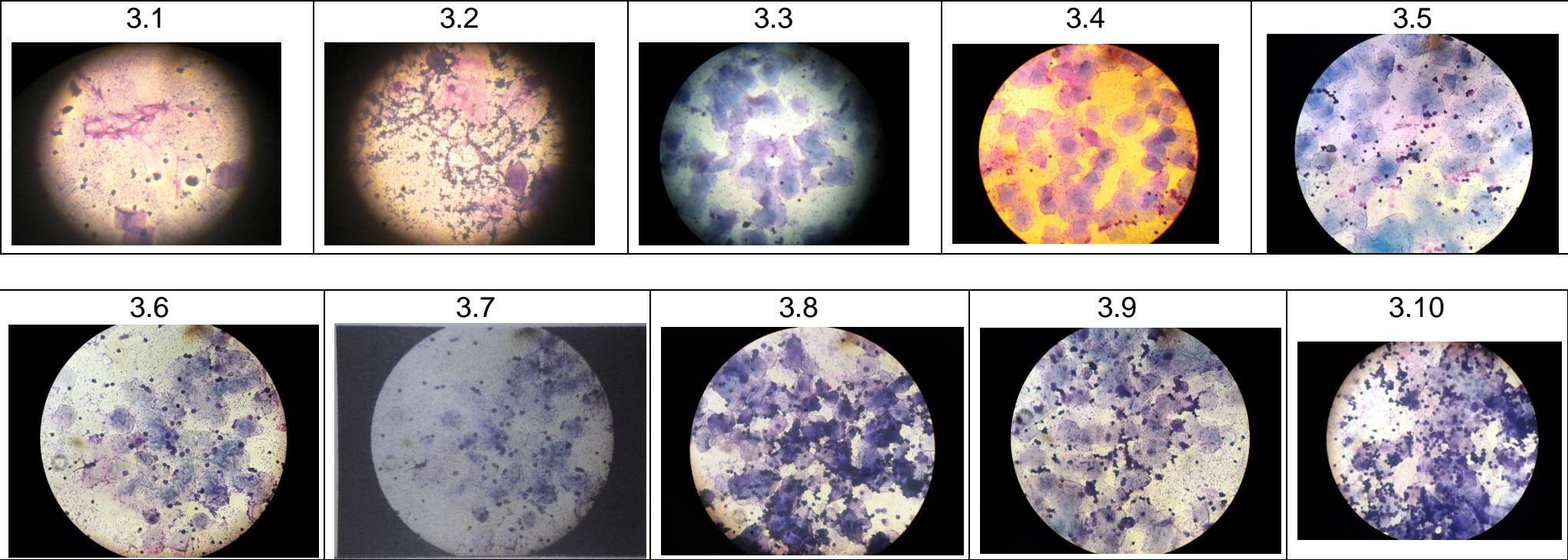


Higt 3,43 setelah di crop

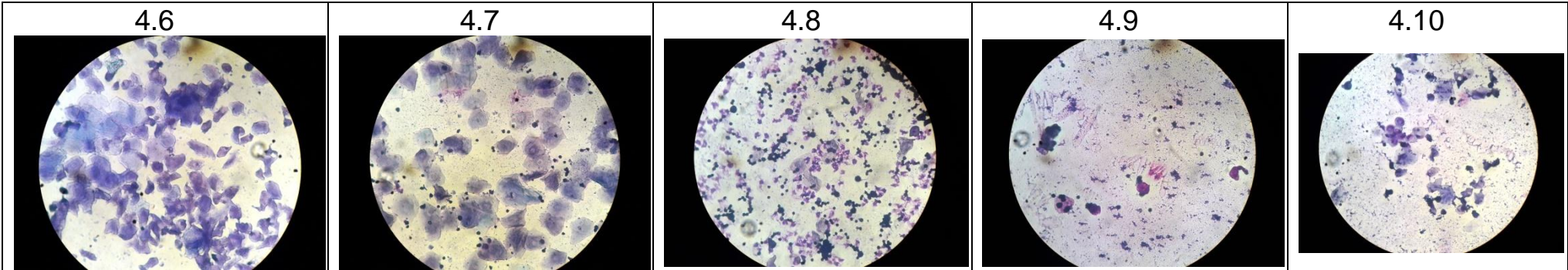
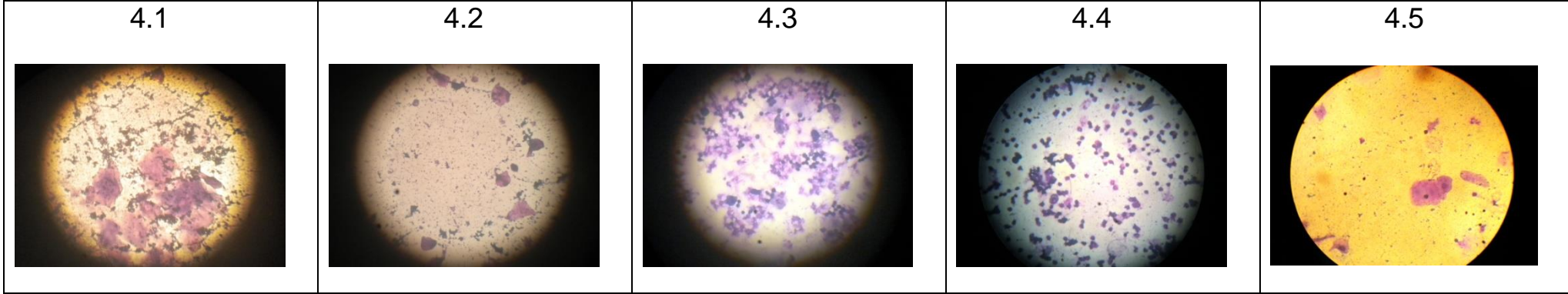
KLP I-02



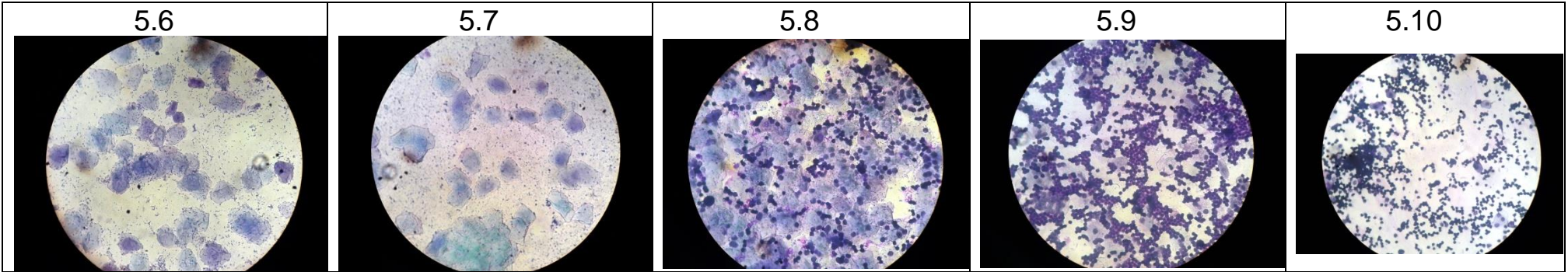
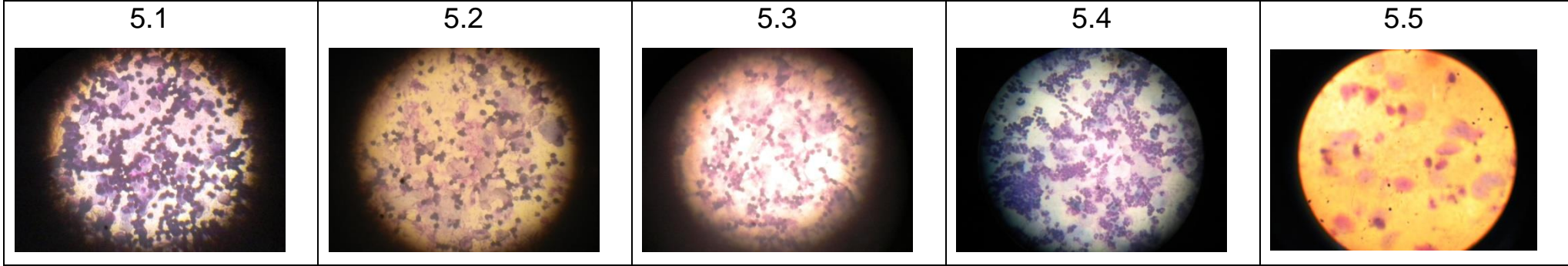
KLP I-03



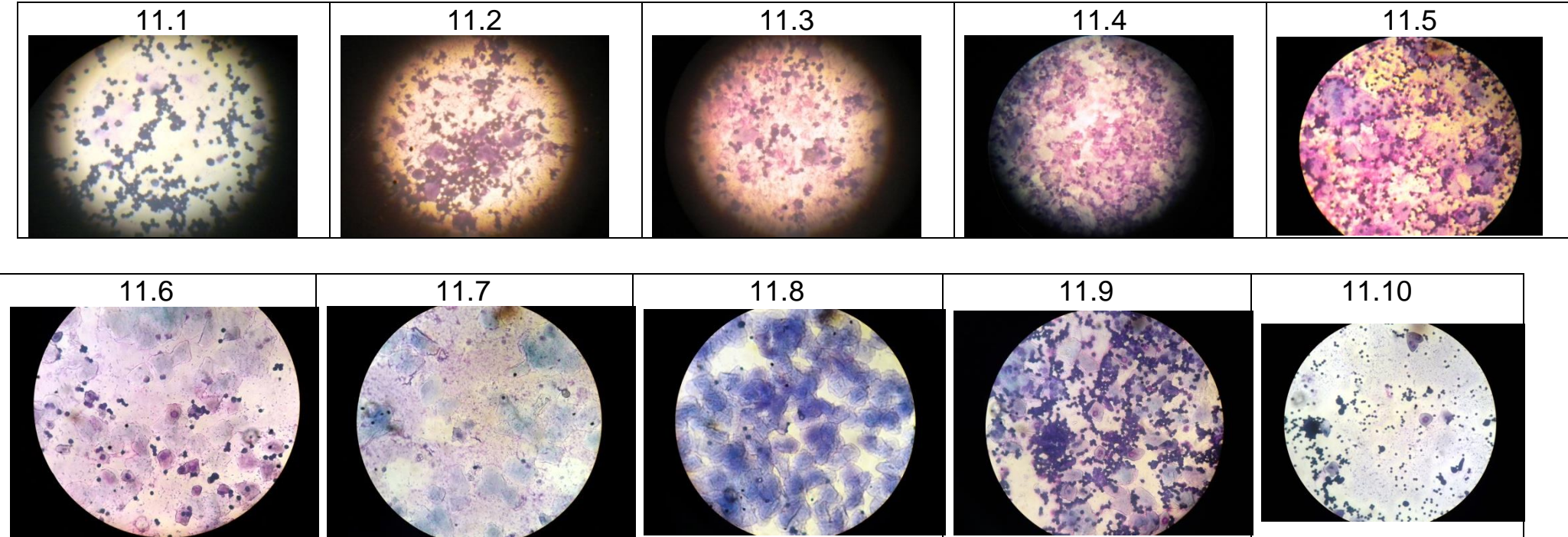
KLP I-04



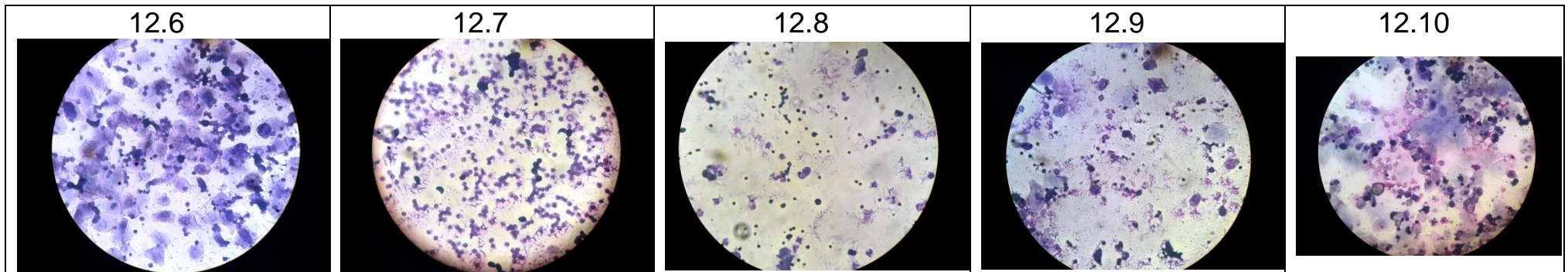
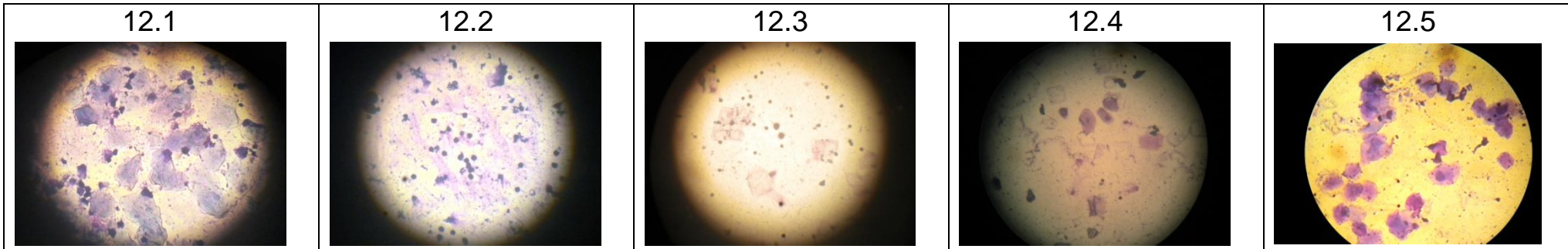
KLP I-05



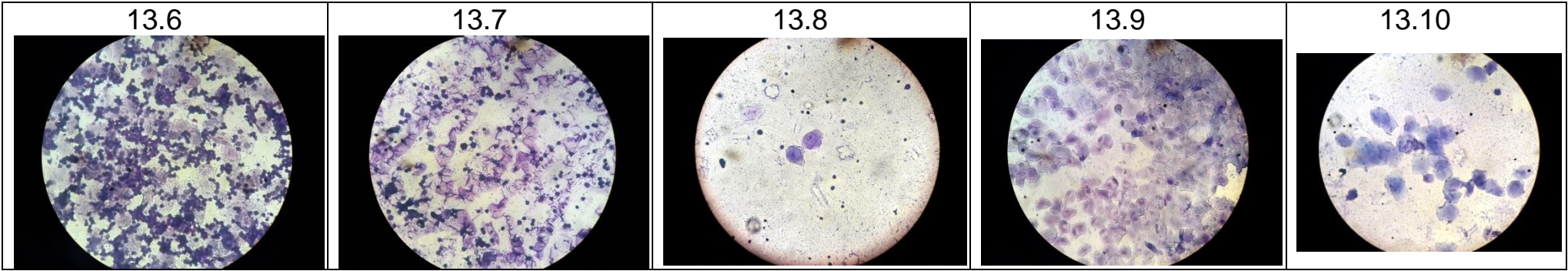
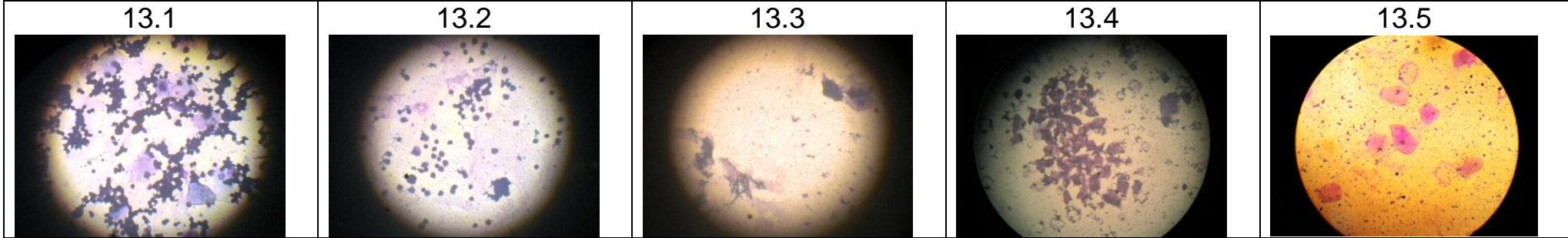
KLP II-11



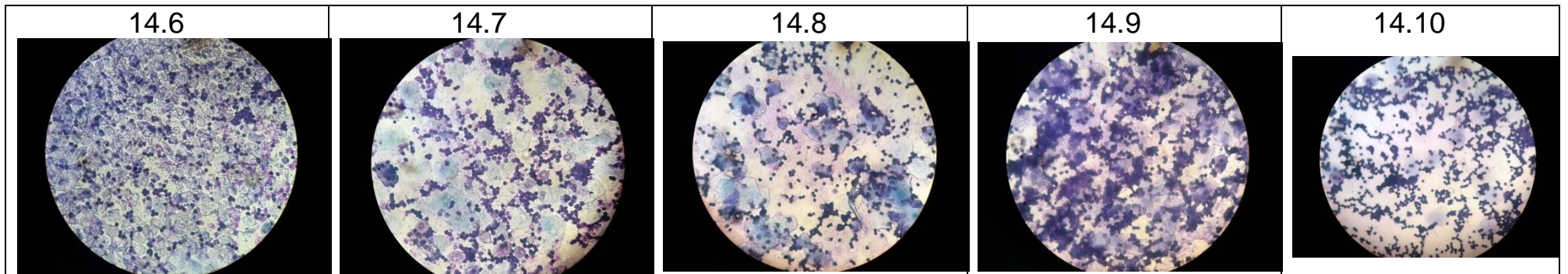
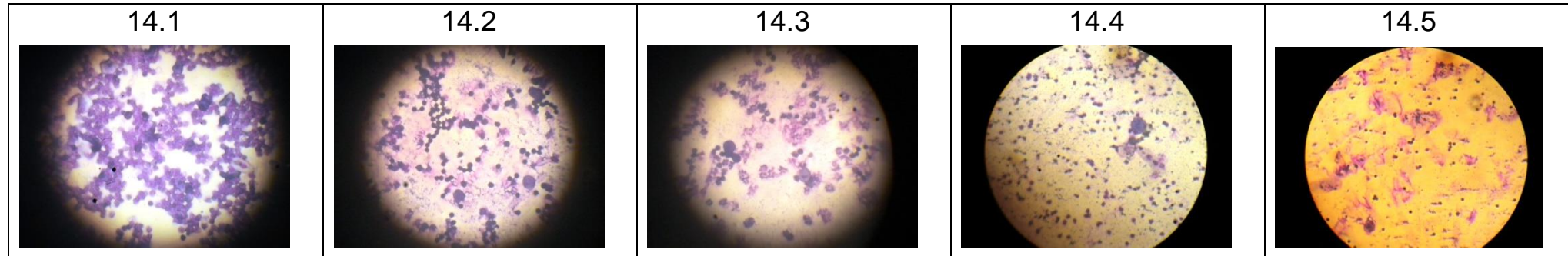
KLP II-12



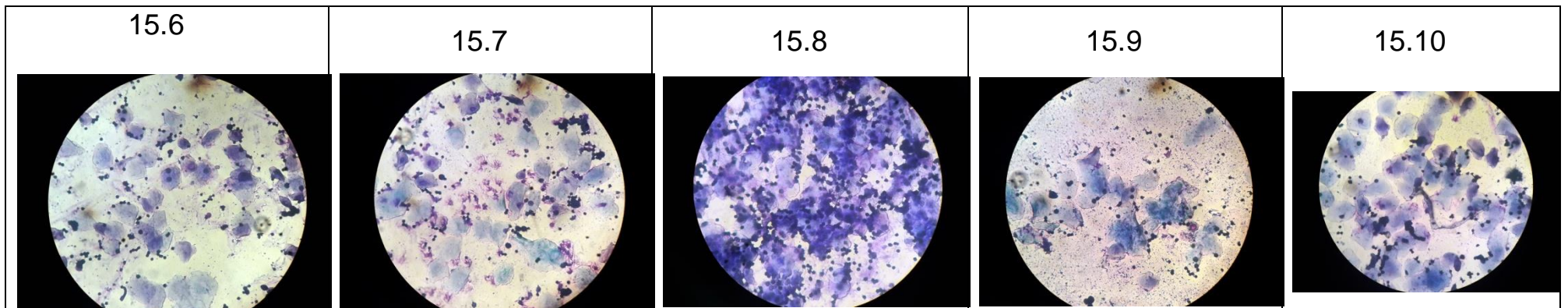
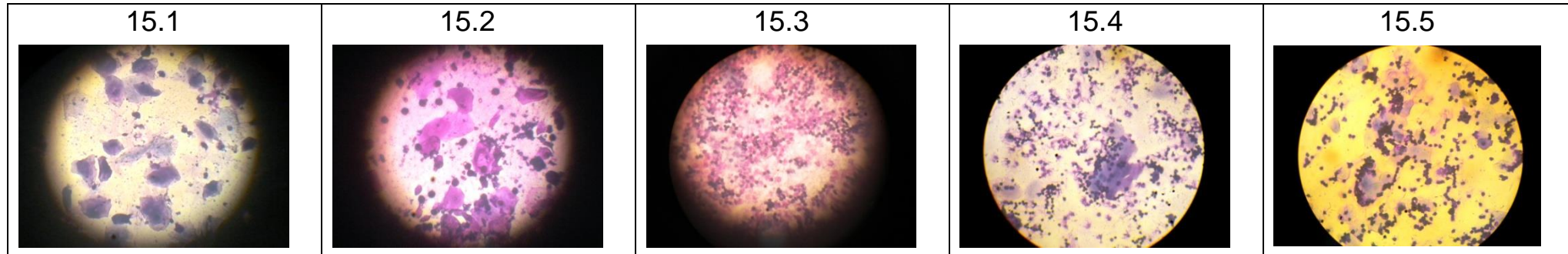
KLP II-13



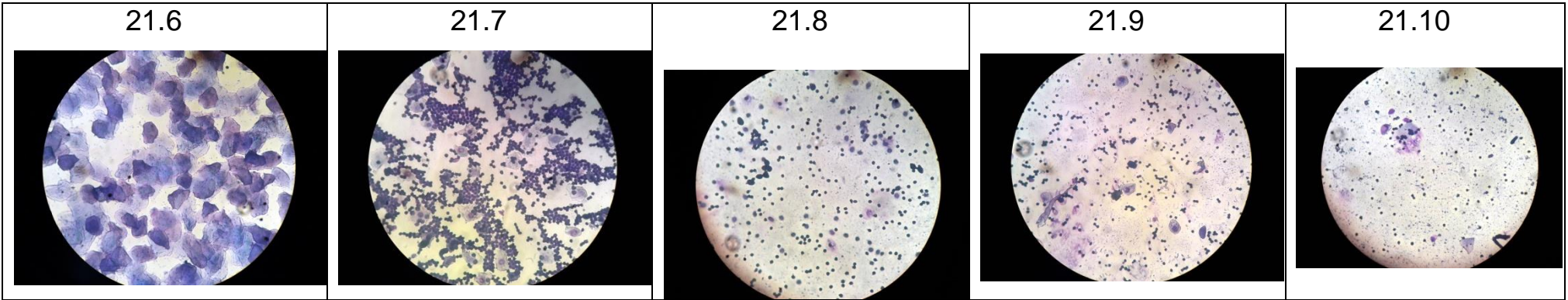
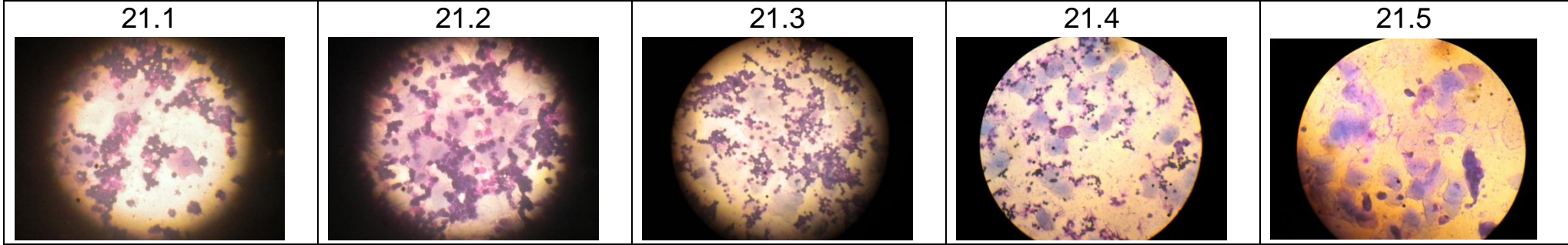
KLP II-14



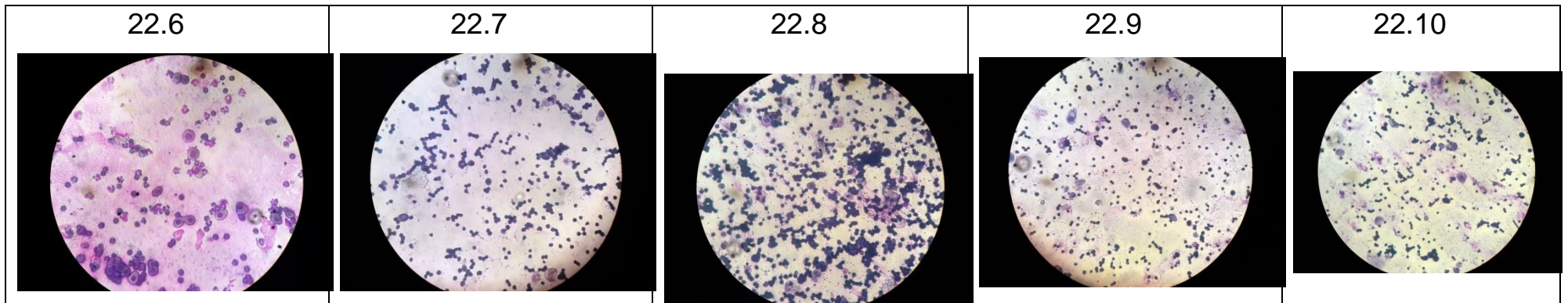
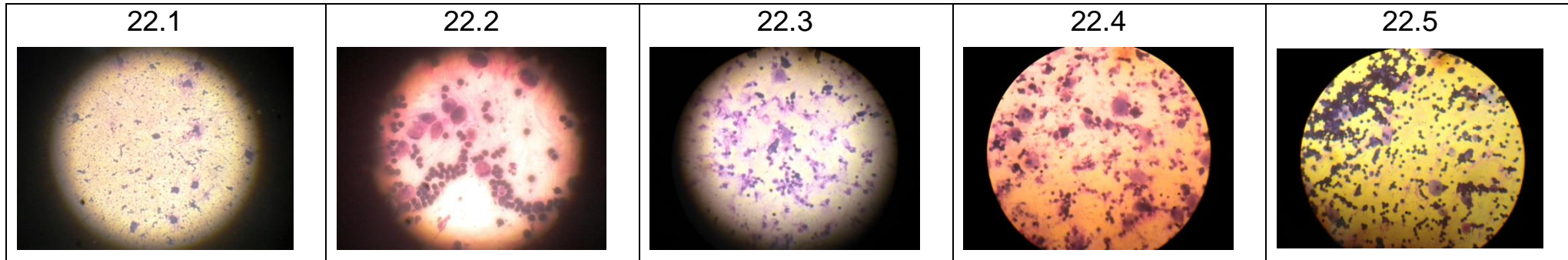
KLP II-15



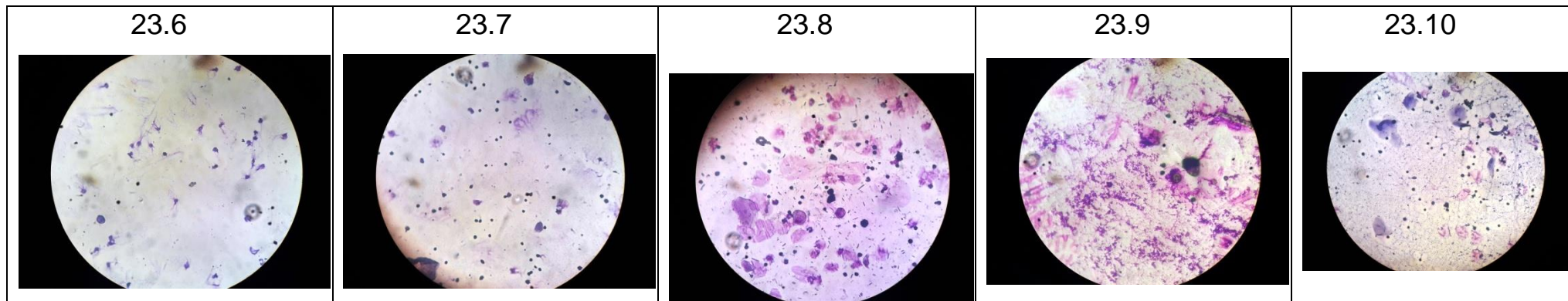
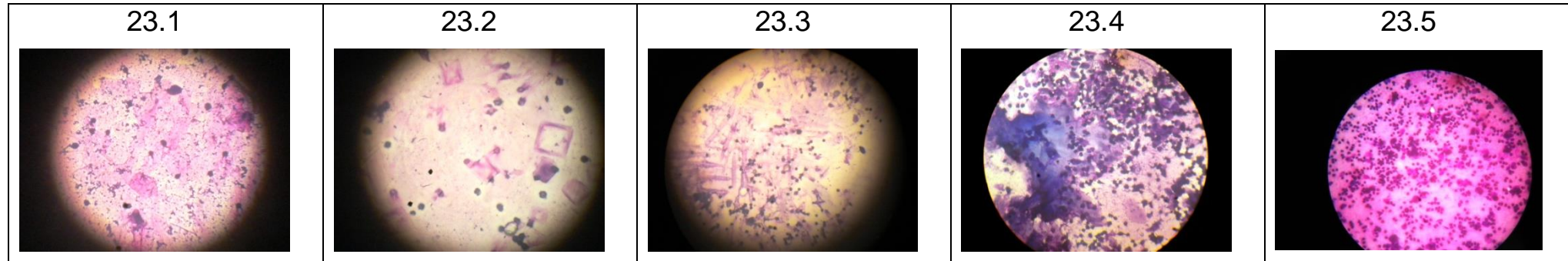
KLP III-21



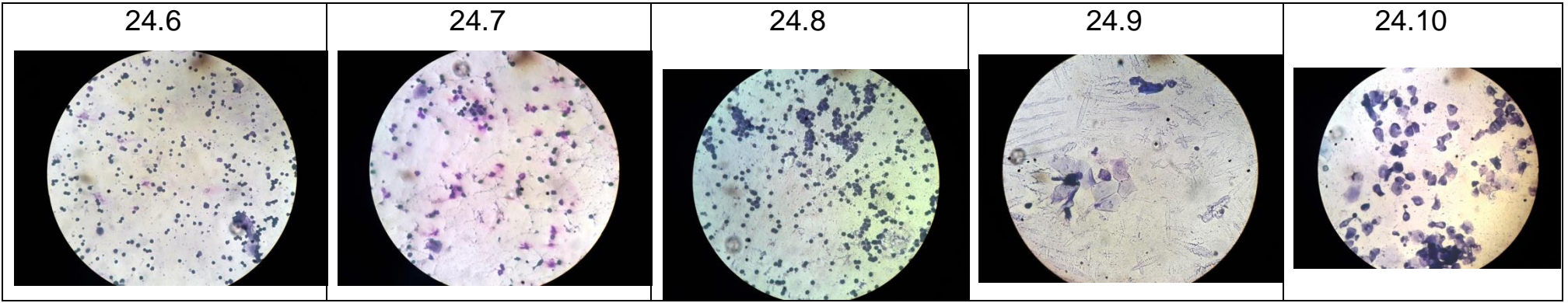
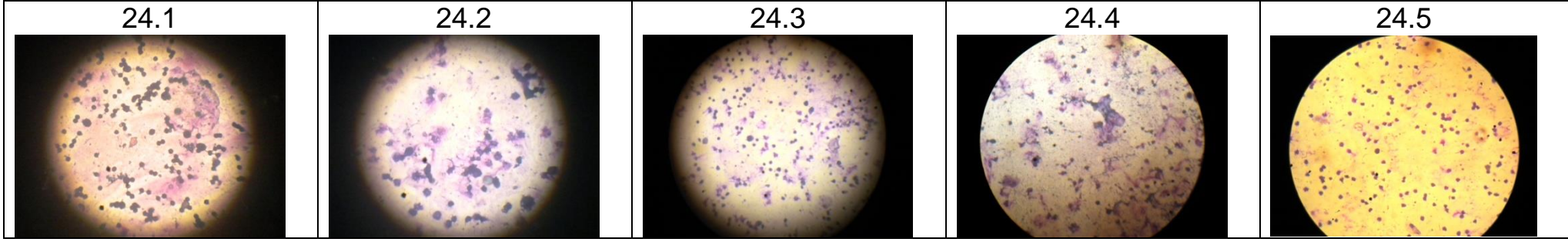
KLP III-22



KLP III-23



KLP III-24



KLP III-25

