

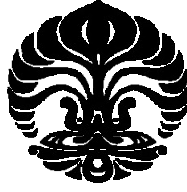
UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS HORMON  
PROGESTERON PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*, Berkenhout  
1769) BETINA MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *FOURIER  
TRANSFORM INFRARED* (FTIR)**

**SKRIPSI**

**ADE SEPTIAN  
0606069501**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS HORMON  
PROGESTERON PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*, Berkenhout  
1769) BETINA MENGGUNAKAN TEKNOLOGI *FOURIER  
TRANSFORM INFRARED* (FTIR)**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**ADE SEPTIAN  
0606069501**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan  
semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Ade Septian**  
**NPM : 0606069501**  
**Tanda Tangan : **  
**Tanggal : 18 Juni 2011**


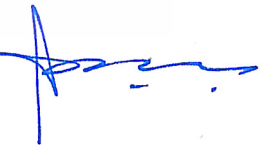
**HALAMAN PENGESAHAN**

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Ade Septian  
NPM : 0606069501  
Program Studi : Biologi  
Judul Skripsi : Pengembangan Metode Analisis Hormon Progesteron pada Tikus (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) Betina Menggunakan Teknologi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia**

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing I : Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. (  )  
Pembimbing II : Dr. Dadang Kusmana, M.S. (  )  
Penguji I : Dra. Setiorini, M.Kes. (  )  
Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 27 Juni 2011



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa dan Guru Agung Siddhartha Gautama atas berkah dan tuntunan-Nya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M.Biomed. dan Dr. Dadang Kusmana, M.S., selaku Pembimbing I dan II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan saya dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini;
- (2) Dra. Setiorini, M.Kes. dan Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc., selaku Penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan saran untuk perbaikan skripsi ini;
- (3) Dr. Abinawanto selaku Penguji Seminar Hasil Penelitian yang telah memberikan masukan untuk perbaikan skripsi ini;
- (4) Dr. Andi Salamah selaku Penasehat Akademis yang telah membimbing dan membantu saya selama masa perkuliahan;
- (5) Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining B. Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, dan Drs. Ellyzar I.M.Adil, M.Si. (alm) selaku staf pengajar yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan kepada saya selama ini. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada Bu Ida, Bu Rusmalina, dan Mbak Asri atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada saya;
- (6) Prof. Dr. Ir. M. Nasikin, M.Eng. yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan yang saya perlukan dalam penyusunan skripsi ini;
- (7) Keluarga tercinta, mama (Sindy Mariana), papa (Edi Hartono), kakak (Ferry Hartono), dan sepupu (Liana) yang telah memberikan cinta, kasih sayang, dukungan, dan doa;
- (8) Kak Alvin, Mas Rasyid, Pak Jajat, Shafar, dan teman-teman KP (Edis, Pute, Dewi, Jill, Nova, Oim) yang telah banyak membantu saya dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan;

(9) *DanceDanceRevolution crew* (Eri, Echi, Uli, Hani, Adryan, Jojo, Salman, Zico, Rifqi, Maria, Kak Ari, Dimas, Afi, Berto, Peter, Damas, Ko Chris, Iro, Thias, Astrit, Citra, Faiz, Iqbal, Abel, Albert) yang telah memberikan bantuan, dukungan, doa, dan kenangan manis yang tidak terlupakan;

(10) Kelompok “Banzai Blue” (Jeje, Asri, Lili, Ile, Arief, Egie, Kak Adiep, Kak Putra), “Bekicot” (Betty, Rara, Nia, Yenyen, Indria, Prety, Topan), dan segenap rekan “Felix” yang telah memberikan banyak bantuan dan dukungan selama di ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, 18 Juni 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ade Septian  
NPM : 0606069501  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengembangan Metode Analisis Hormon Progesteron pada Tikus (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) Betina Menggunakan Teknologi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 18 Juni 2011  
Yang menyatakan



(Ade Septian)

## ABSTRAK

Nama : Ade Septian  
Program Studi : S1 Biologi  
Judul : Pengembangan Metode Analisis Hormon Progesteron pada Tikus (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) Betina Menggunakan Teknologi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Telah dilakukan pemeriksaan hormon progesteron pada tikus betina (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) menggunakan FTIR. Penelitian bertujuan mengetahui bilangan gelombang dan nilai absorbansi gugus fungsi spesifik progesteron dalam darah selama siklus estrus, dan mengetahui keabsahan FTIR dalam mengukur konsentrasi hormon progesteron. Sampel darah dari sepuluh ekor tikus pada fase estrus dan diestrus yang ditentukan melalui ulas vagina dianalisis melalui FTIR dan *radioimmunoassay* (RIA). Nilai absorbansi dari gugus fungsi spesifik progesteron, yaitu keton ( $1724\text{ cm}^{-1}$ ), metil ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ), dan metil-keton ( $1354\text{ cm}^{-1}$ ), dibandingkan dengan nilai absorbansi asam karboksilat ( $1425\text{ cm}^{-1}$ ) pada hemoglobin. Konsentrasi progesteron saat estrus melalui RIA dan FTIR berturut-turut adalah  $17,593 \pm 4,246\text{ ng/ml}$  dan  $0,853 \pm 0,310\%$ ; saat diestrus adalah  $76.218 \pm 4.687\text{ ng/ml}$  dan  $1,024 \pm 0.268\%$ .

Kata kunci : FTIR, gugus fungsi, progesteron, RIA, siklus estrus, tikus, ulas vagina  
xii + 41 halaman : 21 gambar; 6 tabel  
Daftar referensi : 56 (1951—2011)

## ABSTRACT

Name : Ade Septian  
Study Program : S1 Biology  
Title : Development of Progesterone Analysis Method on  
Female Rat (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) Using  
Fourier Transform Infrared (FTIR)

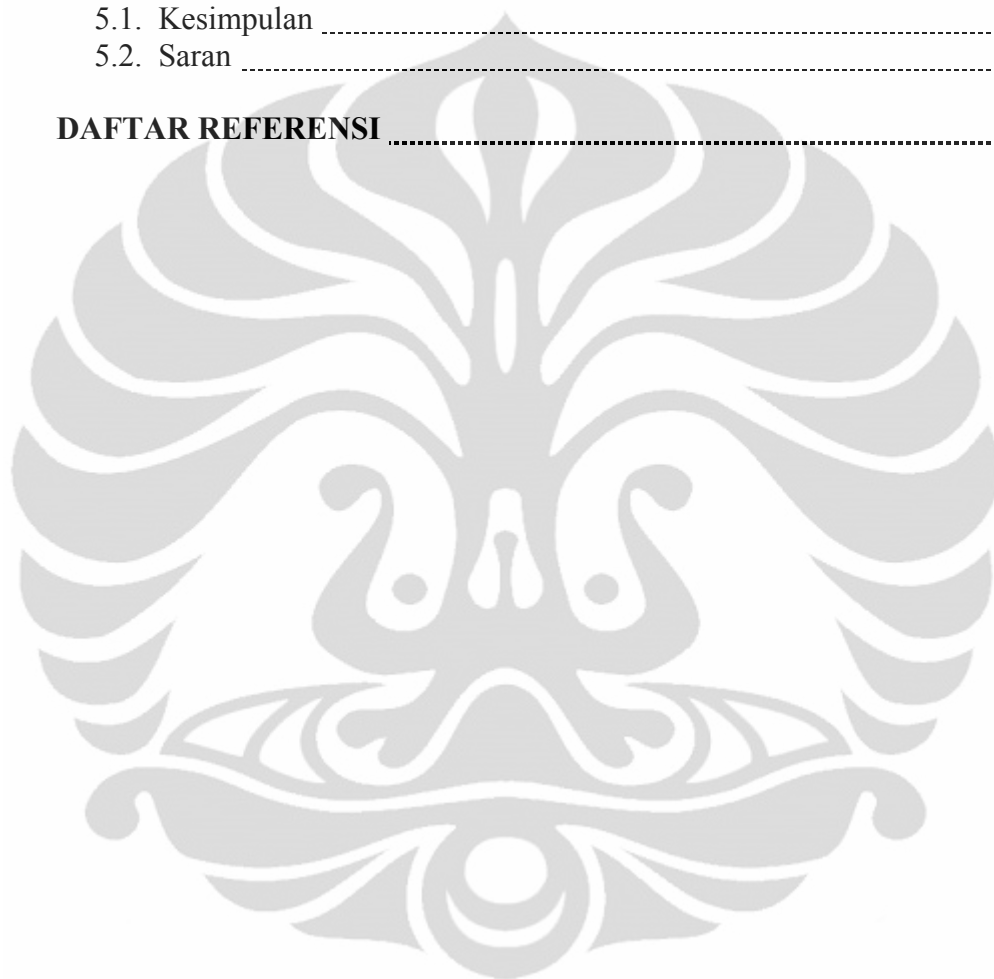
Research in determining progesterone concentration on female rat (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769) using FTIR has been conducted. The aim of this research was to determine the wavenumbers and absorbance values of progesterone's functional groups in blood during estrous cycles, and to verify the FTIR's capability in measuring progesterone concentration in blood. Blood samples from ten females which were taken at estrus and diestrus phases determined by vaginal smear, analyzed by FTIR and Radioimmunoassay (RIA). Absorbance values of progesterone's functional groups, such as ketone ( $1724\text{ cm}^{-1}$ ), methyl ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ), and methyl-ketone ( $1354\text{ cm}^{-1}$ ), were measured relatively to absorbance values of hemoglobin's carboxylic acid ( $1425\text{ cm}^{-1}$ ). Progesterone concentration at estrus by RIA and FTIR are  $17,593 \pm 4,246\text{ ng/ml}$  and  $0,853 \pm 0,310\%$  respectively; at diestrus are  $76.218\text{ ng/ml}$  and  $1,024 \pm 0.268\%$  respectively.

Keywords : estrous cycles, FTIR, functional groups, progesterone, rat,  
RIA, vaginal smear  
xii + 41 pages : 21 figures; 6 tables  
Bibliography : 56 (1951—2011)

## DAFTAR ISI

|   |           |
|---|-----------|
| HALAMAN JUDUL .....                                 | ii        |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....               | iii       |
| HALAMAN PENGESAHAN .....                            | iv        |
| KATA PENGANTAR .....                                | v         |
| HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....    | vii       |
| ABSTRAK .....                                       | viii      |
| ABSTRACT .....                                      | ix        |
| DAFTAR ISI .....                                    | x         |
| DAFTAR GAMBAR .....                                 | xii       |
| DAFTAR TABEL .....                                  | xiii      |
| <br>  |           |
| <b>1. PENDAHULUAN .....</b>                         | <b>1</b>  |
| <br>  |           |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>                    | <b>3</b>  |
| 2.1. <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR) ..... | 3         |
| 2.1.1. Pengenalan dan Prinsip Kerja .....           | 3         |
| 2.1.2. Komponen Penyusun dan Cara Kerja FTIR .....  | 6         |
| 2.2. Metode Pemantauan Kesuburan Betina .....       | 7         |
| 2.2.1. Kualitatif .....                             | 7         |
| 2.2.1.1. Ulas Vagina .....                          | 7         |
| 2.2.1.2. Pengamatan Genitalia .....                 | 8         |
| 2.2.2. Kuantitatif .....                            | 9         |
| 2.2.2.1. <i>Enzyme Immunoassay</i> (EIA) .....      | 9         |
| 2.2.2.2. <i>Radioimmunoassay</i> (RIA) .....        | 9         |
| 2.2.2.3. <i>Maturation Index</i> (MI) .....         | 10        |
| 2.3. Hewan Uji .....                                | 11        |
| 2.3.1. Klasifikasi dan Persebaran .....             | 11        |
| 2.3.2. Morfologi dan Fisiologi .....                | 11        |
| 2.3.3. Tikus sebagai Hewan Uji .....                | 12        |
| 2.3.4. Siklus Estrus .....                          | 14        |
| 2.4. Cairan Tubuh dan Pengumpulannya .....          | 16        |
| 2.5. Hormon Steroid Seks .....                      | 18        |
| <br>  |           |
| <b>3. METODE PENELITIAN .....</b>                   | <b>20</b> |
| 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....              | 20        |
| 3.2. Alat .....                                     | 20        |
| 3.3. Bahan .....                                    | 20        |
| 3.4. Cara Kerja .....                               | 21        |
| 3.4.1. Pemeliharaan Hewan Uji .....                 | 21        |
| 3.4.2. Penentuan Fase dalam Siklus Estrus .....     | 21        |
| 3.4.3. Pengumpulan Sampel Darah .....               | 22        |
| 3.4.4. Analisis FTIR .....                          | 23        |
| 3.4.5. Analisis RIA .....                           | 24        |
| 3.4.6. Analisis Data .....                          | 25        |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....                              | 26 |
| 4.1. Penentuan Fase dalam Siklus Estrus melalui Ulas Vagina ..... | 26 |
| 4.2. Pengumpulan Sampel Darah .....                               | 27 |
| 4.3. Analisis Spektrum FTIR .....                                 | 27 |
| 4.3.1. Penentuan Gugus Fungsi Hemoglobin .....                    | 31 |
| 4.3.2. Penentuan Gugus Fungsi Progesteron .....                   | 34 |
| <b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                              | 39 |
| 5.1. Kesimpulan .....   | 39 |
| 5.2. Saran .....  | 39 |
| <b>DAFTAR REFERENSI</b> .....                                     | 40 |



## DAFTAR GAMBAR

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| Gambar 2.1.1.     | Fourier Transform Infrared (FTIR) .....   | 3  |
| Gambar 2.1.2.     | Skema Cara Kerja FTIR .....   | 7  |
| Gambar 2.3.2.     | Profil Hormon Reproduksi Tikus Selama<br>Satu Siklus Estrus .....   | 12 |
| Gambar 2.3.3.     | <i>Rattus norvegicus</i> Strain Sprague-Dawley .....  | 13 |
| Gambar 2.3.4.     | Populasi Sel Epitel Vagina <i>R. norvegicus</i> Selama<br>Satu Siklus Estrus .....  | 15 |
| Gambar 2.4.       | Rumus Bangun Hemoglobin .....   | 17 |
| Gambar 2.5 (1).   | Rumus Bangun Progesteron .....  | 18 |
| Gambar 2.5 (2).   | Jalur Sintesis Steroid Seks oleh Sel Ovari .....  | 19 |
| Gambar 3.4.2.     | Penentuan Fase dalam Siklus Estrus melalui Ulas Vagina ...  | 22 |
| Gambar 3.4.3.     | Pengumpulan Sampel Darah .....  | 22 |
| Gambar 3.4.4 (1). | Komponen-komponen <i>Assembly Cell</i> .....  | 23 |
| Gambar 3.4.4 (2). | Perakitan <i>Assembly Cell</i> untuk Analisis FTIR .....  | 24 |
| Gambar 4.1.       | Populasi Sel Epitel Vagina <i>R. norvegicus</i><br>saat Estrus dan Diestrus .....   | 26 |
| Gambar 4.3 (1).   | Spektrum FTIR dari Darah <i>R. norvegicus</i> saat Estrus .....   | 28 |
| Gambar 4.3 (2).   | Spektrum FTIR dari Darah <i>R. norvegicus</i> saat Non-estrus ..  | 29 |
| Gambar 4.3 (3).   | Spektrum FTIR dari Progesteron Murni .....  | 30 |
| Gambar 4.3.1.     | Nilai absorbansi Asam Karboksilat ( $1396\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$ ) .....  | 32 |
| Gambar 4.3.2 (1). | Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif Keton<br>( $1724\text{ cm}^{-1}$ ) saat Estrus dan Non-estrus .....            | 35 |
| Gambar 4.3.2 (2). | Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif Metil<br>( $1375\text{ cm}^{-1}$ ) saat Estrus dan Non-estrus .....            | 36 |
| Gambar 4.3.2 (3). | Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif<br>Metil-Keton ( $1354\text{ cm}^{-1}$ ) saat Estrus dan Non-estrus .....      | 36 |
| Gambar 4.3.2 (4). | Grafik Ekuivalensi Nilai Absorbansi Relatif Progesteron<br>melalui FTIR dengan Konsentrasi Progesteron<br>melalui RIA ..... | 38 |



## DAFTAR TABEL

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| Tabel 2.1.1 (1). | Korelasi Absorbansi Inframerah dan Frekuensinya .....   | 4  |
| Tabel 2.1.1 (2). | Spektrum Senyawa Pembanding .....   | 5  |
| Tabel 2.2.2.3.   | Nilai MI Setiap Fase dan Hormon yang Bekerja .....  | 10 |
| Tabel 4.3.1.     | Nilai Absorbansi Asam Karboksilat ( $1425\text{ cm}^{-1}$ )<br>yang Merepresentasikan Hemoglobin dari 10 Ekor Tikus ..... | 33 |
| Tabel 4.3.2 (1). | Nilai Absorbansi Gugus Fungsi Spesifik Progesteron<br>dari 10 Ekor Tikus .....  | 34 |
| Tabel 4.3.2 (2). | Ekivalensi Nilai Absorbansi Relatif Progesteron melalui<br>FTIR dengan Konsentrasi Progesteron melalui RIA .....          | 37 |



## BAB I PENDAHULUAN

Kelangsungan hidup suatu spesies ditentukan oleh kesuksesan reproduksi. Kesuksesan tersebut sangat terkait dengan masa subur betina yang diatur oleh hormon reproduksi, yaitu estrogen dan progesteron (Catt & Dufau 1981: 91; Chedrese 2009: 7). Pemantauan masa subur penting dilakukan agar variasi fungsi reproduksi suatu spesies dan populasinya dapat diketahui (O'Connor *dkk.* 2003: 1139). Informasi mengenai fungsi reproduksi tersebut dapat memberikan kontribusi untuk upaya konservasi spesies-spesies endemik (Semiadi *dkk.* 2005: 861).

Masa subur suatu spesies dapat dipantau melalui metode kualitatif dan kuantitatif. Metode kualitatif yang umum digunakan dalam studi kesuburan ialah ulas vagina. Metode tersebut mampu memantau perubahan bentuk dan populasi sel epitel vagina di bawah pengaruh hormon reproduksi (Maeda *dkk.* 2000: 154). Masa subur juga dapat dipantau secara kualitatif melalui metode pengamatan genitalia. Metode tersebut hanya efektif digunakan pada beberapa spesies tertentu yang mampu memperlihatkan pembengkakan dan perubahan warna pada vagina (Champlin *dkk.* 1973: 492).

*Enzyme Immunoassay* (EIA) dan *radioimmunoassay* (RIA) merupakan contoh metode kuantitatif yang juga umum digunakan dalam studi kesuburan (Stavisky 1995: 289; Ziegler *dkk.* 1996: 94). Kedua metode tersebut mampu memberikan hasil pengukuran yang akurat. Meskipun demikian, keduanya memiliki beberapa kekurangan, di antaranya adalah alat dan bahan yang relatif mahal, masa kadaluwarsa relatif pendek, tidak efisien untuk sampel yang sedikit, tidak dapat dipakai berulang, dan resiko terpajan radioisotop yang bersifat destruktif (Maryam 2007: 19--21). Oleh karena itu, diperlukan suatu metode alternatif yang memiliki keunggulan tersendiri.

Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR) merupakan salah satu metode alternatif yang diujicoba. *Fourier Transform Infrared* merupakan alat universal yang dapat menganalisis sampel dalam berbagai jenis dan wujud. Alat tersebut mampu mengenali gugus fungsi spesifik pada suatu senyawa secara

akurat. Selain akurat, FTIR juga praktis, dapat dipakai berulang, aman, dan sensitif (Smith 1979: 3 & 123; Rintoul *dkk.* 1998: 576; Thermo Nicolet 2001: 3). Selain itu, analisis menggunakan FTIR hanya memerlukan sampel dalam jumlah sedikit. Alat tersebut telah digunakan untuk analisis komponen kimiawi batu pada kandung empedu (Kleiner *dkk.* 2002: 13), analisis sampel darah dari pasien penderita gagal ginjal (Renuga Devi *dkk.* 2009: 49), pengukuran protein plasma dalam darah (Petibois *dkk.* 2001: 733), pengukuran kualitas susu (Suseno & Firdausi 2008: 26), diagnosis tumor payudara (Dimitrova *dkk.* 2009: 299), dan pengukuran konsentrasi estradiol dalam darah (Sjahfirdi *dkk.* 2010: A 003).

Keakuratan metode EIA dan RIA dalam mengukur konsentrasi hormon reproduksi menjadikan keduanya sebagai metode yang paling umum digunakan hingga saat ini. Penelitian mengenai penggunaan FTIR sebagai alat pengukur konsentrasi hormon reproduksi dalam darah belum pernah dilakukan, sehingga belum diketahui tingkat keakuratannya. Hormon reproduksi yang diuji adalah progesteron karena keberadaannya mengindikasikan pola steroidogenesis dalam siklus reproduksi (McKerns 1969: 77). Keberadaan hormon tersebut juga dapat digunakan untuk memantau ovulasi (Molina 2010: 200--205).

Penelitian dilakukan untuk mengetahui bilangan gelombang dari gugus fungsi yang mewakili progesteron dan nilai absorbansinya yang menunjukkan konsentrasi progesteron dalam darah saat estrus dan non-estrus. Selanjutnya, mengetahui keabsahan FTIR dalam mengukur konsentrasi progesteron dalam darah dan membandingkan hasilnya dengan hasil pengukuran metode kuantitatif, RIA. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai metode alternatif untuk pemeriksaan konsentrasi hormon reproduksi.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

#### 2.1.1 Pengenalan dan prinsip kerja

*Fourier Transform Infrared (FTIR)* (Gambar 2.1) merupakan alat yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa-senyawa baru, penentuan jumlah molekul dalam suatu sampel, dan penentuan kualitas suatu sampel (Thermo Nicolet 2001: 2). Alat tersebut mampu menganalisis senyawa organik maupun anorganik dalam berbagai wujud: padat, cair, dan gas. Sensitivitas, kecepatan, dan keakuratan analisis menjadi alasan pemanfaatan FTIR dalam berbagai disiplin ilmu seperti kimia, fisika, dan biologi (Rintoul *dkk.* 1998: 576).



Gambar 2.1.1. *Fourier Transform Infrared*

Hampir semua molekul dapat menyerap sinar inframerah pada frekuensi tertentu. Dua molekul senyawa dengan struktur kimia yang berbeda memiliki jenis ikatan dan frekuensi vibrasi yang juga berbeda (Perez & Meyer 2001: 1—2). Meskipun jenis ikatan sama, namun jenis senyawa berbeda, frekuensi vibrasi yang

dihasilkan juga berbeda. Oleh karena itu, pola spektrum FTIR yang dihasilkan bersifat khas dan disebut dengan *fingerprint* (Smith 1979: 3 & 123). *Fourier Transform Infrared* dapat mendeteksi suatu sampel pada tingkat gugus fungsi. Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan *peak* absorbansi yang terbentuk pada spektrum FTIR dengan tabel korelasi (Tabel 2.1.1 (1)) dan spektrum senyawa pembanding (Tabel 2.1.1 (2)) (Anam *dkk.* 2007: 83).

Tabel 2.1.1 (1). Korelasi absorbansi inframerah dan frekuensinya

| Gugus fungsi                       | Jenis vibrasi                  | Frekuensi (cm <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| NH <sub>2</sub>                    | <i>Asymmetrical stretching</i> | 3400—3300                     |
|                                    | <i>Symetrical stretching</i>   | 3300—3250                     |
|                                    | <i>Bending</i>                 | 1650—1550                     |
| NHR                                | <i>Stretching</i>              | 3500—3200                     |
| OH                                 | <i>Stretching</i>              | 3600—3200                     |
| CH (sp)                            | <i>Stretching</i>              | 3350—3250                     |
| CH (sp <sup>2</sup> )              | <i>Stretching</i>              | 3100—3000                     |
| CH <sub>x</sub> (sp <sup>3</sup> ) | <i>Stretching</i>              | 2990—2850                     |
|                                    | <i>Bending</i>                 | 1475—1350                     |
| BH                                 | <i>Terminal stretching</i>     | 2650—2250                     |
|                                    | <i>Bridging stretching</i>     | 2200—1500                     |
| PH                                 | <i>Stretching</i>              | 2450—2280                     |
| C=O                                | <i>Stretching</i>              | 1850—1650                     |
| P=O                                | <i>Stretching</i>              | 1300—1175                     |
| P-O                                | <i>Stretching</i>              | 1100—900                      |
| BN                                 | <i>Stretching</i>              | 1275—1175                     |

[Sumber: Mudzakir 2008: 77.]

Tabel 2.1.1 (2). Spektrum senyawa pembandingan

| Gugus fungsi   | Frekuensi (cm <sup>-1</sup> )   | Intensitas  |
|--|---|---|
| Alkil<br>C-H ( <i>stretching</i> )<br>Isopropil-CH (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>Tert-Butil-C (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub><br>-CH <sub>3</sub> ( <i>bending</i> )<br>-CH <sub>2</sub> ( <i>bending</i> ) | 2853—2962<br>1380—1385<br>1365—1370<br>1385—1395 dan<br>1365<br>1375—1450<br>1465       | Sedang-tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Sedang<br>Tajam<br>Sedang<br>Sedang                                   |
| Alkenil<br>C-H ( <i>stretching</i> )<br>C=C ( <i>stretching</i> keluar bidang)<br>R <sub>2</sub> C=CH <sub>2</sub><br>Cis-RCH=CHR<br>Trans-RCH=CHR   | 3010—3095<br>1600—1680<br>985—1000<br>905—920<br>880—900<br>675—730<br>960—975          | Sedang<br>Sedang-lemah<br>Tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Tajam                                     |
| Alkunik<br>=C-H ( <i>stretching</i> )<br>C=C ( <i>stretching</i> )   | 3300<br>2100—2250   | Tajam<br>Lemah-tajam  |
| Aromatik<br>C=C Ar-H ( <i>stretching</i> )<br>Substitusi aromatik<br>(C-H <i>bending</i> keluar bidang)<br>Mono<br>Orto<br>Meta<br>Para  | 1475 dan 1600<br>3030<br>690—710<br>730—770<br>735—770<br>680—725<br>750—810<br>790—840 | Sedang-lemah<br>Tajam<br>Sangat tajam<br>Sangat tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Sangat tajam<br>Sangat tajam |
| Alkohol, fenol, asam karboksilat<br>OH (alkohol, fenol)<br>OH (alkohol, fenol, ikatan hidrogen)<br>OH (asam karboksilat, ikatan hidrogen)  | 3590—3650<br>3300—3600<br>2400—3400   | Sedang<br>Sedang<br>Sedang  |
| Aldehida, keton, ester, dan asam karboksilat<br>C=O ( <i>stretching</i> )<br>Aldehida<br>Keton<br>Ester<br>Asam karboksilat  | 1600—1820<br>1690—1740<br>1650—1730<br>1735—1750<br>1735—1750                           | Tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Tajam<br>Tajam   |

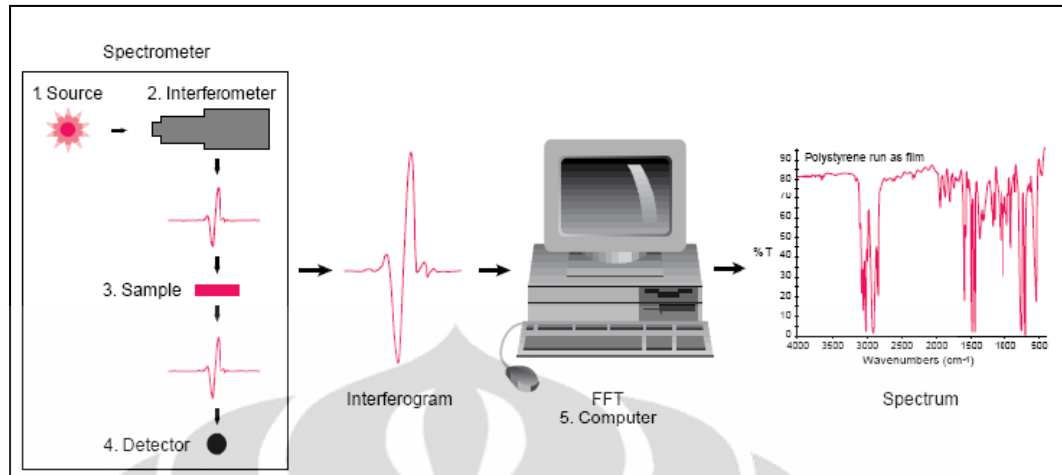
(sambungan)

|  |   |   |
|--|---|---|
| Amida<br>Anhidrida   | 1710—1780<br>1760 dan 1810  | Tajam<br>Tajam                            |
| Amida<br>N-H   | 3100—3500   | Sedang                                    |
| Nitril<br>C=N  | 2240—2260   | Sedang-tajam                              |
| Alkohol, eter, ester,<br>asam karboksilat, anhidrida<br>C-O<br>Aldehida (C-H)<br>Nitro (N=O) | 1000—1300<br>2700—2800 dan<br>2800—2900<br>1300—1390 dan<br>1500—1600 | Tajam<br>Lemah<br>Lemah<br>Tajam<br>Tajam |

[Sumber: Mudzakir 2008: 78—80.]

### 2.1.2 Komponen penyusun dan cara kerja FTIR

*Fourier Transform Infrared* tersusun oleh sumber inframerah, interferometer, kompartemen sampel, detektor, dan komputer. Cara kerja FTIR (Gambar 2.1.2) diawali dengan penembakan sinar inframerah dari sumber menuju sampel. Sinar inframerah tersebut kemudian memasuki interferometer, tempat berlangsungnya penyandian spektrum dan pembentukan sinyal interferogram. Sinar inframerah kemudian memasuki kompartemen sampel dan sampel akan menyerap atau meneruskan sinar tersebut. Sinar inframerah kemudian memasuki detektor untuk pengukuran sinyal interferogram. Selanjutnya, sinyal yang terukur tersebut diolah komputer menjadi spektrum FTIR (Thermo Nicolet 2001: 5; Suseno & Firdausi 2008: 24—25).



Gambar 2.1.2. Skema cara kerja FTIR  
[Sumber: Thermo Nicolet 2001: 5.]

## 2.2 Metode pemantauan kesuburan betina

### 2.2.1 Kualitatif

#### 2.2.1.1 Ulas vagina

Metode ulas secara umum dilakukan dengan membuat lapisan tipis dari bahan cair atau semi cair di atas *glass object*. Metode tersebut umumnya digunakan dalam pembuatan sediaan darah, spermatozoa, mukosa mulut, dan mukosa vagina (Bain 2006: 9—11). Sediaan umumnya difiksasi dalam alkohol atau *metilen blue* sebelum diwarnai. Fiksasi bertujuan menghentikan reaksi biokimia sel dan mematikan sel tanpa merusak komponennya (Houwen 2000: 3). Pewarnaan sediaan dilakukan agar sel yang satu dengan yang lainnya dapat dibedakan, sesuai dengan sifat sel terhadap penyerapan zat warna (Johnson 1991: 3). Agen pewarna yang umum digunakan ialah Hematoxylin Eosin (HE) dan Giemsa (Ross *dkk.* 2002: 5—6).

Sejak keberhasilan Stokard dan Papanicolaou meneliti siklus estrus marmut pada tahun 1917, ulas vagina menjadi metode yang umum digunakan dalam studi kesuburan hingga saat ini (Champlin *dkk.* 1973: 491). Metode tersebut dapat menunjukkan bentuk dan populasi sel epitel vagina yang selalu



berubah dari waktu ke waktu, di bawah pengaruh hormon reproduksi. Berbagai fase dalam siklus estrus dapat ditentukan berdasarkan populasi sel pada sediaan ulas vagina (Mandl 1951: 577; Lloyd 1952: 16; Maeda *dkk.* 2000: 154—155).

Alat dan bahan untuk membuat sediaan ulas vagina relatif murah dan mudah diperoleh. Namun, keterampilan sangat diperlukan untuk mendapatkan sediaan yang baik. Kurangnya keterampilan pengambilan sampel, pengulasan sampel di atas *glass object*, hingga pemeriksaan sediaan di bawah mikroskop, dapat mengakibatkan data menjadi bias. Selain itu, penggunaan metode dalam jangka waktu lama dan berulang dapat membuat hewan uji menjadi stres (Champlin *dkk.* 1973: 493).

#### 2.2.1.2 Pengamatan genitalia

Fase dalam siklus estrus juga dapat diketahui melalui metode yang lebih praktis, yaitu pengamatan genitalia. Champlin *dkk.* (1973: 493) menggunakan pembengkakkan vagina menciit sebagai parameter penentu fase dalam siklus estrus. Derajat pembengkakkan vagina dicirikan dengan perubahan warna dan kelembapan jaringan, ukuran bukaan vagina, dan keberadaan sel debris pada vagina.

Proestrus dicirikan dengan vagina yang melebar, jaringan berwarna merah muda kemerahan dan lembab, serta lipatan pada bibir dorsal dan ventral; ciri-ciri saat estrus mirip seperti proestrus, namun jaringan berwarna merah muda terang dan kelembapan berkurang, serta lipatan lebih banyak; saat metestrus bibir dorsal menyusut, jaringan berwarna pucat dan kering; saat diestrus vagina sedikit terbuka, jaringan berwarna ungu kebiruan dan sangat lembab. Pengamatan genitalia lebih sederhana dan cepat dibandingkan ulas vagina. Pengamatan juga tidak menimbulkan stres berlebih pada hewan uji. Meskipun demikian, penggunaan metode tersebut hanya terbatas pada beberapa spesies dan *strain* (Champlin *dkk.* 1973: 492—494).

## 2.2.2 Kuantitatif

### 2.2.2.1 *Enzyme Immunoassay* (EIA)

*Enzyme Immunoassay* merupakan metode pemeriksaan keberadaan antibodi atau antigen dalam sampel. Metode tersebut telah digunakan untuk diagnosis penyakit dan *quality control* dalam dunia industri. Antigen yang tidak diketahui jumlahnya (sampel) ditambahkan antibodi yang berikatan dengan enzim. Antibodi tersebut akan berikatan dengan antigen, sehingga enzim menjadi bebas. Substrat kemudian ditambahkan agar berikatan dengan enzim bebas tersebut (Anwar 2005: 15; Leng dkk. 2008: 883).

Aktivitas enzim pada substrat dapat menghasilkan reaksi kimia berupa produk berwarna atau *chemiluminescence*. Pengukuran *chemiluminescence* tersebut bersifat sensitif. Intensitas warna yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah antigen dan antibodi. Pengukurannya dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer atau luminometer. Label indikator yang digunakan dalam EIA ialah *alkaline phosphatase* dan *horseradish peroxidase* (Stanley 2002: 150).

### 2.2.2.2 *Radioimmunoassay* (RIA)

*Radioimmunoassay* merupakan metode pengukuran antigen dalam suatu sampel, contohnya hormon dalam sampel darah. Pengukuran didasari oleh kompetisi antigen berlabel radioisotop dengan antigen tidak berlabel (antigen sampel). Sejumlah antigen berlabel radioisotop dan antibodinya dimasukkan dalam sampel. Antigen sampel akan berikatan dengan antibodi, sehingga antigen berlabel radioisotop menjadi bebas. Jumlah antigen berlabel radioisotop yang bebas diukur untuk mengetahui kadar suatu antigen dalam sampel (Antibody & Beyond 2007: 1). Radioisotop yang digunakan untuk pemeriksaan hormon progesteron adalah  $^{125}\text{I}$  (Nalbandov 1990: 215—216).

Kedua metode kuantitatif tersebut di atas mampu memberikan pengukuran kadar hormon yang akurat, namun, alat dan bahan relatif mahal, masa

kadaluwarsa relatif pendek, pemesanan membutuhkan waktu yang cukup lama, tidak efisien untuk pemakaian sampel yang sedikit, tidak dapat digunakan berulang, dan mengandung radioisotop (Maryam 2007: 19—21). Radioisotop bersifat destruktif karena memancarkan sinar gamma yang merusak jaringan biologis (Stanley 2002: 150).

### 2.2.2.3 *Maturation Index* (MI)

*Maturation Index* merupakan metode pemantauan masa subur dengan cara membandingkan jumlah sel-sel epitel skuamosa vagina. Jumlah sel-sel epitel tersebut mengindikasikan aktivitas estrogen dan progesteron (Tabel 2.2.2.3). Jenis sel yang diamati yaitu sel basalis, intermedia, dan superfisial. Perbandingan jumlah sel-sel tersebut menggambarkan fase yang berlangsung dan hormon yang bekerja. Nilai MI dinotasikan dengan % sel basalis, % sel intermedia, dan % sel superfisial. Pertumbuhan sel basalis mengindikasikan fase tidak dipengaruhi estrogen dan progesteron, pertumbuhan sel intermedia mengindikasikan fase dipengaruhi progesteron, dan pertumbuhan sel superfisial mengindikasikan fase dipengaruhi oleh estrogen (Shefrin 2008: 1).

Tabel 2.2.2.3. Nilai MI setiap fase dan hormon yang bekerja

| Fase                 | Nilai MI | Aktivitas hormon                                  |
|----------------------|----------|---|
| Hari ke-14 (ovulasi) | 0:40:60  | Stimulasi estrogen terbanyak                      |
| Hari ke-28           | 0:70:30  | Stimulasi progesteron terbanyak                   |
| Menopause            | 0:100:0  | Hanya progesteron, tidak ada estrogen             |
| Atrofi               | 100:0:0  | Tidak ada progesteron maupun estrogen             |
| Anak-anak            | 100:0:0  | Tidak ada progesteron maupun estrogen             |
| Pubertas             | 0:90:10  | Stimulasi progesteron terbanyak, sedikit estrogen |
| Kehamilan            | 0:100:0  | Hanya progesteron, tidak ada estrogen             |
| Pasca partum         | 90:10:0  | Stimulasi hormon minimal                          |

[Sumber: Shefrin 2008: 2.]

## 2.3 Hewan uji

### 2.3.1 Klasifikasi dan persebaran

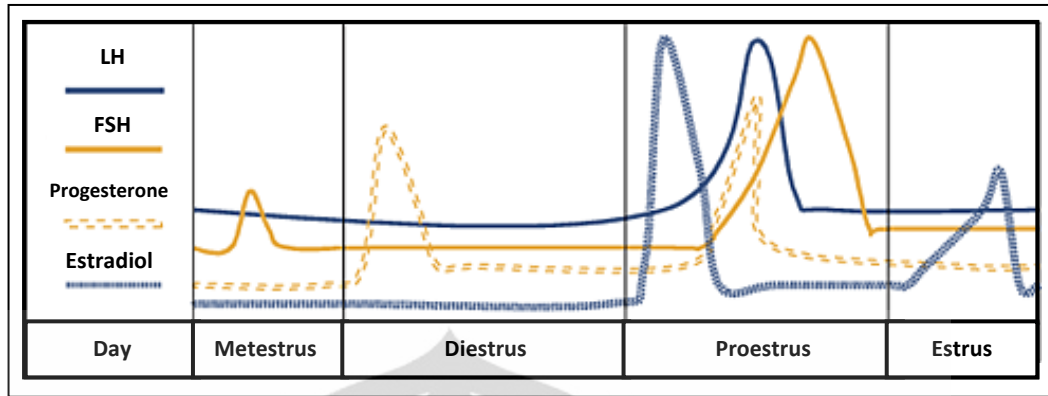
Klasifikasi *Rattus norvegicus* adalah sebagai berikut:

|           |   |
|-----------|---|
| Filum     | : Chordata                                |
| Kelas     | : Mamalia                                 |
| Ordo      | : Rodentia                                |
| Subordo   | : Myomorpha                               |
| Famili    | : Muridae                                 |
| Subfamili | : Murinae                                 |
| Genus     | : <i>Rattus</i>                           |
| Spesies   | : <i>R. norvegicus</i> (Berkenhout, 1769) |

Secara geografis, tikus memiliki daerah persebaran yang luas. Hewan pengerat tersebut dapat ditemukan di negara-negara Mediterania, Timur Tengah, India, Cina, Jepang, Asia Tenggara, dan Australia (Hedrich 2006: 72—73).

### 2.3.2 Morfologi dan fisiologi

Tikus yang normal dan sehat umumnya bertubuh panjang dan ramping. Hampir seluruh permukaan tubuh ditutupi oleh rambut, kecuali hidung, bibir, permukaan palmar dan plantar kaki, dan ekor. Rambut umumnya kusam dan kasar. Telinga relatif besar dan moncong tirus. Bola mata tikus menonjol karena plica semilunaris tereduksi. Bibir bagian atas terbelah oleh philtrum, yaitu cekungan vertikal yang berakhir di bawah nares. Ekstremitas anterior dan posterior terdiri atas lima digiti. Panjang ekor dapat mencapai 85% dari panjang tubuh. Betina pada umumnya memiliki ekor yang lebih panjang dibandingkan pejantan. Bukaan vagina terletak sekitar 7 mm dari bagian ventral anus (Hedrich 2000: 3; Hofstetter *dkk.* 2006: 94). Sistem reproduksi pada tikus terdiri atas vagina, uterus, kelenjar mammae, dan ovarium (Grant 2011: 1).



Gambar 2.3.2. Profil hormon reproduksi tikus selama satu siklus estrus  
[Sumber: Emanuele *dkk.* 2003: 1.]

Aktivitas ovarium selama siklus estrus diatur oleh gonadotropin yang disekresikan oleh pituitari anterior. Kadar estradiol meningkat seiring dengan perkembangan folikular saat proestrus awal. Kadar estradiol meningkat saat pagi hari proestrus dan menurun saat siang harinya. Peningkatan kadar estradiol diikuti oleh peningkatan kadar progesteron, *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Gambar 2.3.2) (Maeda *dkk.* 2000: 155—156).

### 2.3.3 Tikus sebagai hewan uji

*Rattus norvegicus* dan *Mus musculus* merupakan contoh hewan uji yang umum digunakan dalam penelitian biologi dan biomedis. Keduanya digunakan sebagai hewan uji karena memiliki kelebihan, seperti karakter fisiologi yang mirip mamalia lain pada umumnya (Hedrich 2000: 3). *Rattus norvegicus* dan *Mus musculus* juga mudah beradaptasi dan mudah dipelihara (Hem 2005: 96). Mereka memiliki masa kehamilan yang pendek dan kemampuan reproduksi yang baik, sehingga cocok digunakan secara besar-besaran (Hedrich 2006: 71). Selain itu, mereka memiliki siklus estrus yang pendek (4—5 hari), sehingga memudahkan pemantauan masa subur (Sharp & La Regina 1998: 15; Lohmiller & Swing 2006: 149—150).

Tikus yang umum digunakan sebagai hewan uji pada umumnya adalah *strain* Sprague-Dawley, Wistar, dan Long-Evans. *Strain* Sprague-Dawley memiliki kepala yang kecil dan ekor yang melebihi panjang tubuh. *Strain* Wistar memiliki kepala yang besar dan ekor lebih pendek dari panjang tubuh. *Strain* Long-Evans memiliki warna hitam pada bagian kepala dan anterior tubuh, ukuran tubuhnya lebih kecil dibandingkan *strain* lainnya (Lindsey & Baker 2006: 31—33).



Gambar 2.3.3. *Rattus norvegicus strain* Sprague-Dawley

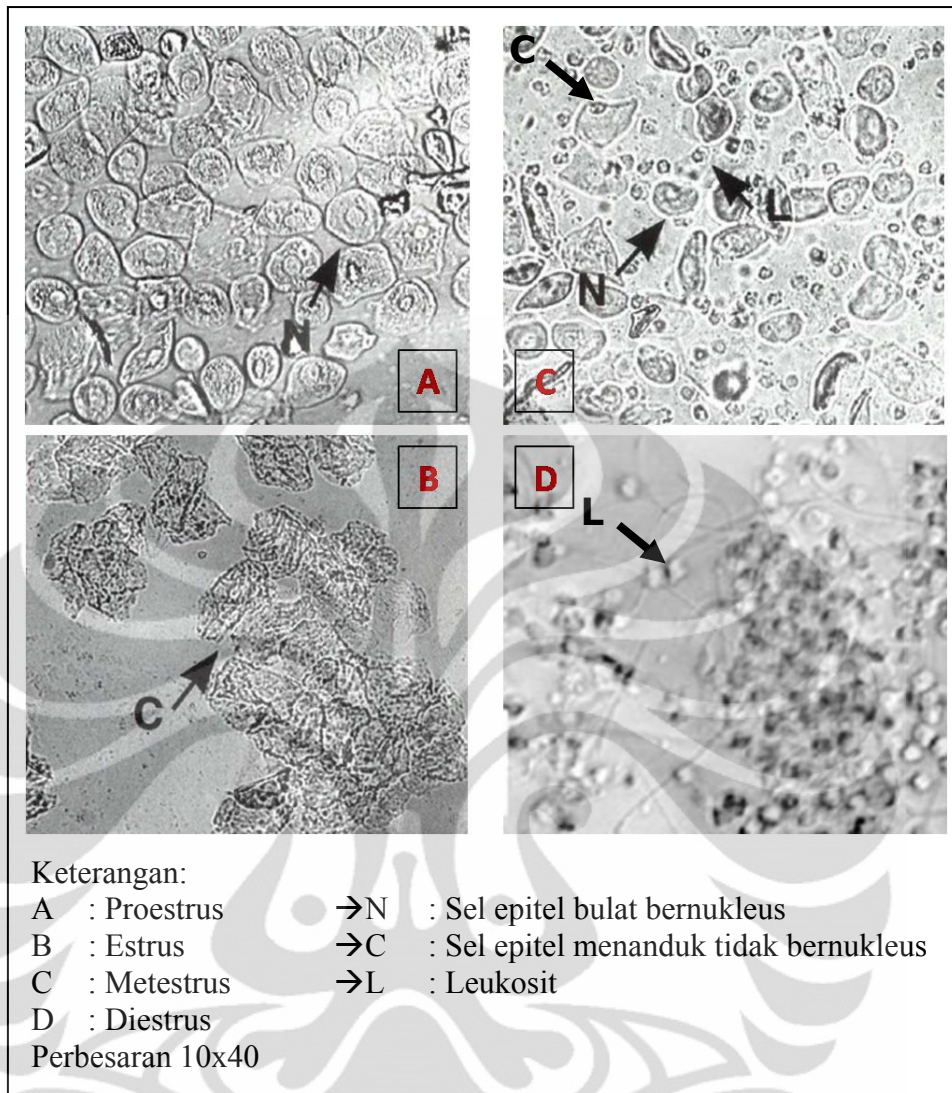
Tikus yang digunakan dalam penelitian ialah *Rattus norvegicus strain* Sprague-Dawley (Gambar 2.3.3). Kelebihan *R. norvegicus* dibandingkan *Mus musculus* terletak pada ukuran tubuhnya yang lebih besar, sehingga memudahkan pengambilan sampel berulang (Hedrich 2006: 72). *Strain* Sprague-Dawley umumnya bertemperamen baik dan memiliki laju pertumbuhan dan masa reproduksi yang relatif cepat (Fitrianti 2002: 5). *Rattus norvegicus strain* Sprague-Dawley telah banyak dimanfaatkan dalam analisis berbagai penyakit, seperti penyakit kardiovaskular, penyakit autoimun, diabetes melitus, epilepsi, kanker, dan penyakit ginjal (Hedrich 2000: 3—4).

#### 2.3.4 Siklus estrus

Estrus atau masa birahi berkala terjadi pada mamalia non-primata (Hadley 2000: 460). Siklus estrus *R. norvegicus* dimulai saat pubertas hingga senesens. Pubertas *R. norvegicus* ditandai dengan pembukaan vagina dan proestrus pertama. Pembukaan vagina terjadi 33—42 hari setelah kelahiran, saat berat badan di atas 100 gram (Maeda *dkk.* 2000: 148—149). Siklus estrus terjadi satu minggu setelah pembukaan vagina. Senesens pada *R. norvegicus* terjadi pada umur 7—9 bulan (Lohmiller & Swing 2006: 153).

Satu siklus estrus *R. norvegicus* berlangsung 4—5 hari dan terdiri atas beberapa fase, yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Panjang siklus estrus setiap individu terkadang berbeda satu sama lain, meskipun tergolong dalam 1 *strain* (Maeda *dkk.* 2000: 155). Panjang siklus estrus tikus dipengaruhi oleh progesteron (Nequin *dkk.* 1979: 669).





Gambar 2.3.4. Populasi sel epitel vagina *R. norvegicus* selama satu siklus estrus  
 [Sumber: Maeda *dkk.* 2000: 155.]

Populasi sel mayoritas pada sediaan ulas vagina saat proestrus ialah sel epitel bulat bernukleus; saat estrus ialah sel epitel menanduk tidak bernukleus; saat metestrus populasi sel terdiri atas sel epitel bulat bernukleus, sel epitel menanduk tidak bernukleus, dan leukosit; saat diestrus ialah leukosit (Gambar 2.3.4) (Warren & Juraska 1997: 260; Marcondes 2002: 612; Westwood 2008: 376—380). Sel-sel epitel menanduk merupakan indikator terjadinya ovulasi (Beimborn *dkk* 2003: 5). Mandl (1951: 583) melaporkan bahwa proestrus berlangsung selama 12—14 jam; estrus 25—27 jam; metestrus 6—8 jam; dan diestrus 55—57 jam.

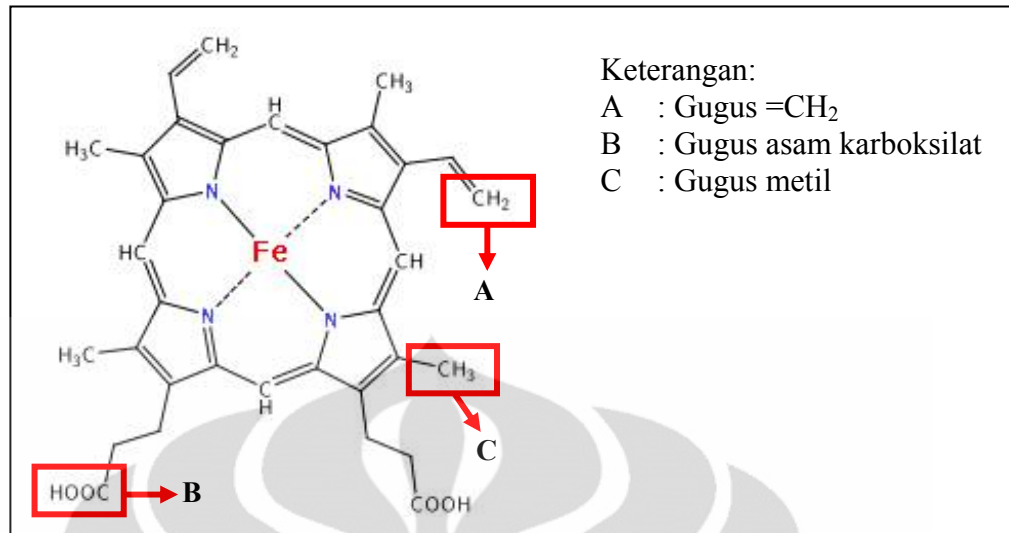


Betina reseptif terhadap jantan selama masa estrus. Reseptivitas tersebut disebut dengan lordosis yang dicirikan dengan dorsifleksi tulang punggung. Perilaku tersebut umumnya dipelajari dalam penelitian mekanisme fisiologi terkait pengaturan perilaku seksual. Perilaku lordosis diinduksi oleh estrogen (Maeda *dkk.* 2000: 171—172; Lohmiller & Swing 2006: 150).

Perbedaan antara siklus estrus dan siklus menstruasi terletak pada pendarahan eksterna. Pendarahan eksterna pada siklus menstruasi disebabkan oleh konstriksi arteri spiral dan peluruhan endometrium pars fungsionalis. Peluruhan endometrium tersebut dipengaruhi oleh penurunan sekresi hormon progesteron oleh korpus luteum. Pars basalis tidak meluruh dan permukaannya yang berbatasan dengan pars fungsionalis akan diperbaiki, sehingga pars fungsionalis dan arteri spiral tetap utuh. Pendarahan tidak terjadi pada siklus estrus. Hal tersebut disebabkan oleh tidak adanya arteri spiral, sehingga yang terjadi adalah perombakan endometrium dan reabsorpsi sel-sel yang sudah tidak dibutuhkan (Nalbandov 1990: 160—161).

#### **2.4 Cairan tubuh dan pengumpulannya**

Cairan tubuh merupakan komponen analisis penting yang dibutuhkan dalam berbagai disiplin ilmu, seperti toksikologi, farmakologi, dan fisiologi. Beberapa cairan tubuh yang umum digunakan untuk analisis diantaranya adalah empedu, air susu, urin, dan darah. Darah merupakan suspensi antara sel (eritrosit, leukosit, dan trombosit) dan plasma (Vander *dkk.* 2001: 483). Darah umumnya diperlukan untuk penentuan tingkat pemajanan suatu bahan uji dan distribusi senyawa obat baru dalam uji pre-klinis (Koch 2006: 593).



Gambar 2.4. Rumus bangun hemoglobin  
 [Sumber: Vander *dkk.* 2001: 484.]

Hemoglobin (Gambar 2.4) terkandung dalam eritrosit. Hemoglobin merupakan molekul dengan atom Fe yang mengikat O<sub>2</sub>. Setiap molekul hemoglobin merupakan protein yang tersusun atas empat ikatan subunit. Setiap subunit tersusun atas kelompok molekul yang disebut heme yang mengikat polipeptida. Heme terikat pada rantai polipeptida oleh atom N untuk membentuk satu subunit hemoglobin. Empat polipeptida pada hemoglobin umumnya disebut dengan globin (Vander *dkk.* 2001: 483—484).

Plasma merupakan komponen penyusun darah yang mengandung air, elektrolit, protein, gas, nutrien, produk sisa metabolisme, dan hormon. Hormon steroid seks terkandung dalam darah dengan bentuk bebas maupun terikat dengan protein-protein pengikat steroid seks dalam plasma. Protein-protein tersebut adalah albumin, globulin pengikat steroid seks, dan globulin pengikat kortikosteroid (Rosner 1990: 88).

Metode pengumpulan darah dari tikus sangat beragam. Berikut adalah beberapa contoh yang umum digunakan:

1. *Retroorbital puncture*

Metode pengumpulan darah dari *plexus retroorbital* tikus dengan menggunakan tabung hematokrit. Metode tersebut mampu mengumpulkan darah sebanyak 1—2 ml. Kurangnya pengalaman dan keterampilan dapat mengakibatkan luka pada kornea dan kerusakan pada serat optik.

## 2. *Dorsal and lateral tail veins*

Metode pengumpulan darah dari vena dorsal atau lateral ekor dengan menggunakan jarum suntik berukuran 23 atau 21. Tikus ditempatkan pada alat pengekang, lalu ekor direndam dalam air hangat (45° C) selama beberapa menit agar pembuluh dilatasi dan terlihat jelas. Darah sebanyak 0,5 ml dapat diperoleh melalui metode tersebut.

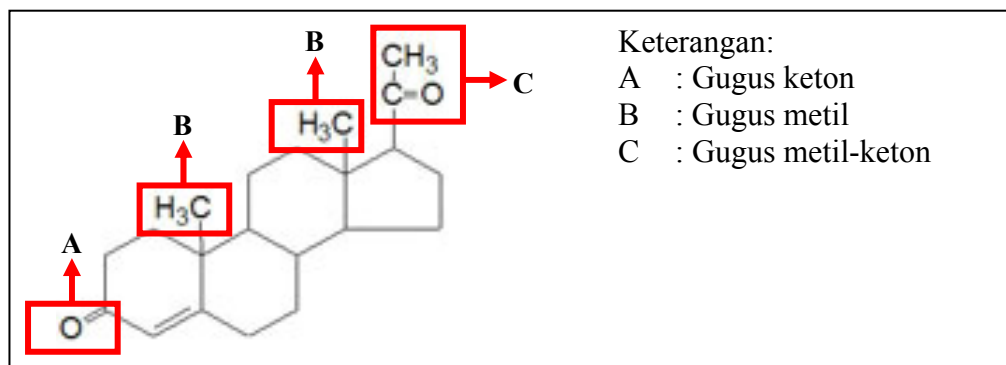
## 3. *Amputation or tail clipping*

Metode pengumpulan darah melalui pemotongan bagian ujung ekor (Weiss *dkk.* 2000: 488—492).

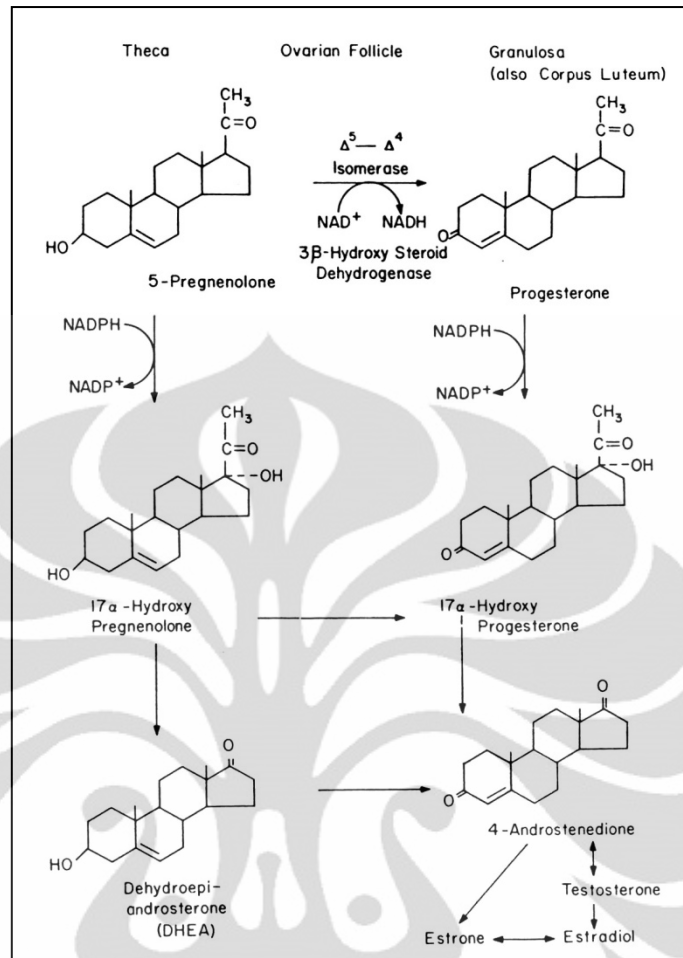
## 2.5 Hormon steroid seks

Hormon yang terlibat dalam aktivitas reproduksi terbagi menjadi lipid, protein, dan monoamin. Hormon reproduksi lipid terdiri atas dua kelas, yaitu eikosanoid dan steroid. Steroid memiliki 4 kelas utama, yaitu androgen, estrogen, progesteron, dan kortikosteroid. Androgen, estrogen, dan progesteron merupakan steroid seks yang terlibat dalam pengaturan pertumbuhan dan fungsi jaringan reproduksi (Catt & Dufau 1981: 91; Anwar 2005: 7).

Kelompok androgen terdiri atas 5 $\alpha$ -dihidrotestosteron, testosteron, androstenedion, dan dehidroepiandrosteron. Kelompok estrogen terdiri atas estradiol 17 $\beta$ , estriol, dan estron. Kelompok progesteron terdiri atas progesteron, 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron, dan 20 $\alpha$ -progesteron (Johnson & Everitt 2000: 34—37).



Gambar 2.5 (1). Rumus bangun progesteron  
 [Sumber: Nunley 2011: 1.]



Gambar 2.5 (2). Jalur sintesis steroid seks oleh sel ovarium  
[Sumber: McKerns 1969: 78.]

Progesteron (Gambar 2.5 (1)) disintesis oleh sel granulosa dan korpus luteum dengan bantuan enzim pengonversi 5-pregnenolon (Gambar 2.5 (2)). Progesteron merupakan prekursor testoteron dan estrogen (McKerns 1969: 78;). Kadar progesteron saat fase folikular adalah sekitar 1 ng/ml. Kadar progesteron saat fase luteal dapat bertahan selama 45 hari di dalam plasma dan mencapai puncaknya, yaitu 10—20 ng/ml (Rogers 2011: 61—62).

Progesteron berperan penting dalam persiapan kelenjar *mamae* untuk laktasi, implantasi ovum pada uterus, dan mempertahankan plasenta selama kehamilan. Pemeriksaan kadar progesteron pada umumnya dilakukan untuk memeriksa fungsi plasenta selama kehamilan, fungsi ovarium pada fase luteal, dan memantau ovulasi. Ovulasi terjadi saat kadar progesteron melebihi 5 ng/ml (Molina 2010: 200—205).

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Rumah Rodensia, Laboratorium Biologi Perkembangan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI), Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI, Depok, dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (FKH IPB), Bogor. Penelitian dilakukan selama 6 bulan (Juli—Desember 2010).

### 3.2 Alat

Peralatan yang digunakan adalah FTIR IRPrestige-21 [Shimadzu]; *cell frame*; *window ZnSe*; *rubber backing*; *screw*; *glass object*; *cutton bud*; kapas; plester; gunting bedah; stoples; pipet mikro [Bio-Rad]; *microtube* 1,5 ml [Axygen]; lemari pendingin [Toshiba]; mikroskop cahaya [Nikon SE]; kamera digital [Canon]; komputer jinjing [Acer]; serta berbagai alat tulis yang umum digunakan.

### 3.3 Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel darah dari 10 (sepuluh) ekor tikus (*Rattus norvegicus*) betina *strain* Sprague-Dawley; EDTA; Metanol [Merck]; larutan Giemsa; eter; antiseptik [Betadine]; *Progesterone* [<sup>125</sup>I] RIA kit [Izotop] yang terdiri atas <sup>125</sup>I-*tracer*, larutan standar, *antiserum*, *control serum*, dan *magnetic immunosorbent*.

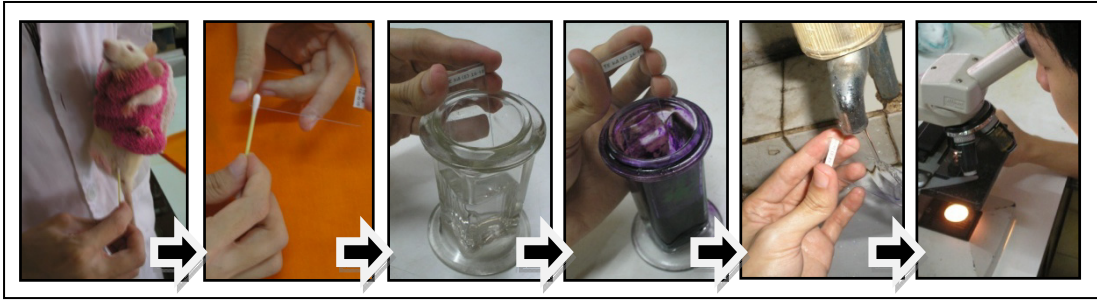
### 3.4 Cara kerja

#### 3.4.1 Pemeliharaan hewan uji

Sepuluh ekor tikus (*Rattus norvegicus*) betina *strain* Sprague-Dawley berumur tiga bulan dipelihara di Rumah Rodensia Departemen Biologi FMIPA UI, Depok. Setiap dua ekor *R. norvegicus* ditempatkan dalam sebuah kandang berukuran (30x20x10) cm<sup>3</sup> beralaskan serbuk kayu. Makanan dan minuman disediakan secara *ad libitum*. Ruang pemeliharaan memiliki siklus 12 jam terang:12 jam gelap, dengan suhu dan kelembapan yang terkontrol. Aklimatisasi hewan uji berlangsung dua minggu, hingga berat badan hewan uji stabil pada 180—200 gram. Berat badan ditimbang setiap tiga hari, pada jam yang sama setiap harinya. Seluruh *R. norvegicus* diberi tanda pengenal menggunakan asam pikrat.

#### 3.4.2 Penentuan fase dalam siklus estrus

Fase dalam siklus estrus setiap individu *R. norvegicus* ditentukan melalui ulas vagina. Sel epitel vagina dikumpulkan dengan memasukkan ujung *cotton bud* ke dalam vagina *R. norvegicus*. *Cotton bud* diputar dengan perlahan untuk mendapatkan sel epitel pada dinding vagina, kemudian diulas di atas *glass object* yang telah diberi label dengan keterangan tanggal dan pengenal individu. Sediaan ulas vagina direndam dalam metanol selama tiga menit, kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam Giemsa selama 15 menit. Sisa pewarnaan kemudian dibersihkan di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Prosedur di atas dilakukan mengikuti standar Laboratorium Biologi Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x40. Hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Pembuatan sediaan ulas vagina dilakukan setiap hari pada jam yang sama, diikuti dengan pengumpulan sampel darah.



Gambar 3.4.2. Penentuan fase dalam siklus estrus melalui ulas vagina

### 3.4.3 Pengumpulan sampel darah

Sampel darah dikumpulkan pada fase estrus dan diestrus selama tiga siklus. Sampel darah diestrus merupakan sampel darah non-estrus. Sampel darah dikumpulkan dengan prosedur sebagai berikut.



Gambar 3.4.3. Pengumpulan sampel darah

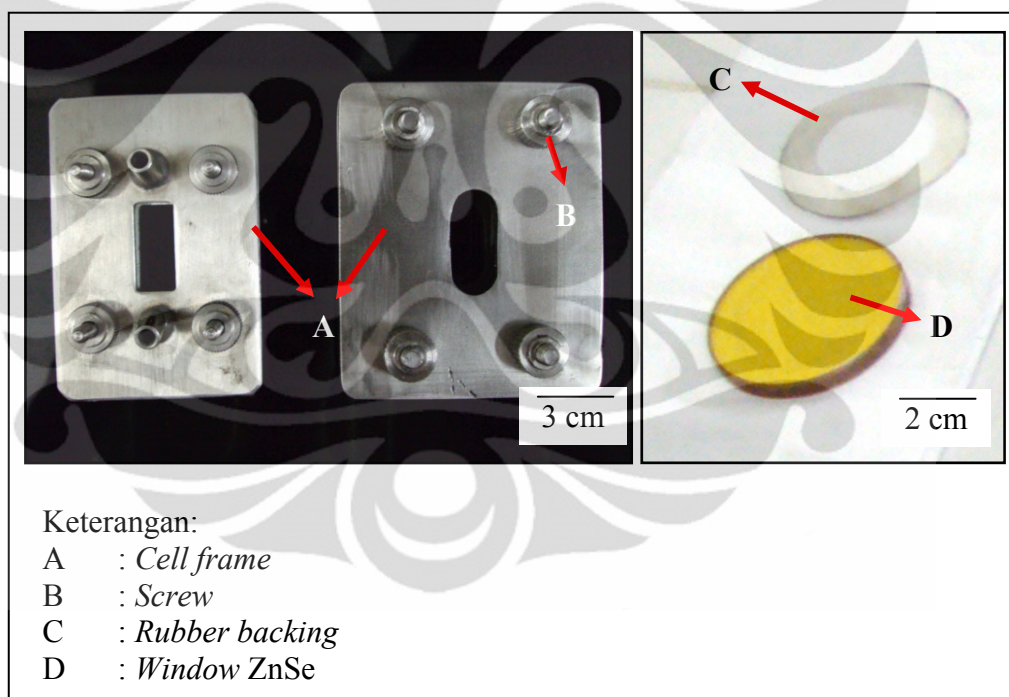
*R. norvegicus* dibius dalam stoples berisi kapas yang telah dibasahi eter. Dalam kondisi terbius, ujung ekor *R. norvegicus* dibasuh dengan antiseptik, kemudian dipotong menggunakan gunting bedah yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Darah yang mengalir kemudian ditampung dalam *microtube* yang telah dilapisi antikoagulan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Luka kemudian diberi antiseptik dan dibalut dengan plester. Darah sebanyak 1 ml



dikumpulkan untuk untuk analisis RIA dan 3 tetes untuk analisis FTIR. Sampel darah kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 8° C. Jumlah sampel darah yang diperoleh adalah 120 buah.

#### 3.4.4 Analisis FTIR

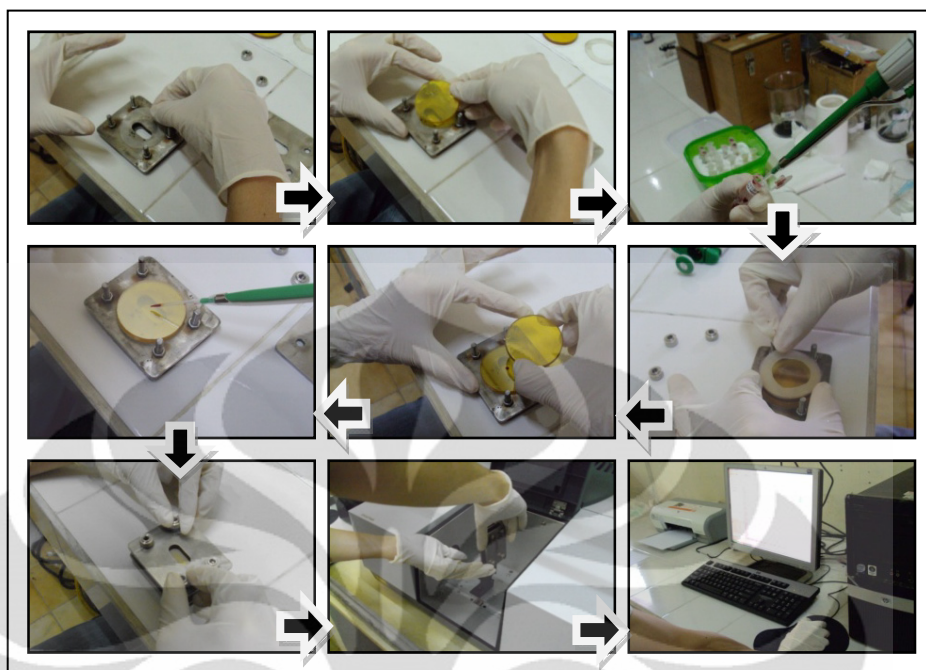
*Fourier Transform Infrared* dihidupkan ketika kompartemen sampel dalam keadaan kosong. Komputer juga dihidupkan, kemudian program IR Solution dijalankan. Blanko kemudian dibuat dengan menempatkan *assembly cell* tanpa sampel pada kompartemen sampel FTIR. Analisis sampel kemudian dilakukan setelah spektrum FTIR dari blanko tertampil.



Gambar 3.4.4 (1). Komponen-komponen *assembly cell*

*Assembly cell* (Gambar 3.4.4 (1)) tersusun atas *cell frame*, *window ZnSe*, *rubber backing*, dan *screw*. Komponen-komponen tersebut digunakan untuk analisis sampel berwujud cair. *Assembly cell* dirakit dengan prosedur sebagai berikut.





Gambar 3.4.4 (2). Perakitan *assembly cell* untuk analisis FTIR

*Rubber backing* diletakkan di atas *cell frame*. *Window ZnSe* kemudian diletakkan di atas *rubber backing* tersebut. Sampel darah sebanyak  $0,5 \mu$  diambil menggunakan pipet mikro, kemudian diteteskan pada bagian tengah *window ZnSe*. *Window ZnSe* kemudian ditumpuk dengan *window ZnSe* lainnya sehingga darah menyebar dan membentuk lapisan tipis. *Rubber backing* kemudian diletakkan di atas tumpukan *window ZnSe*, kemudian ditutup dengan *cell frame* dan *screw*. *Assembly cell* kemudian ditempatkan pada kompartemen sampel FTIR dan selanjutnya dipindai pada bilangan gelombang  $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ . Hasil pemindaian berupa spektrum FTIR kemudian digunakan untuk interpretasi data.

### 3.4.5 Analisis RIA

Sebanyak 60 buah sampel darah untuk analisis RIA dikirim ke Laboratorium Fisiologi FKH IPB, Bogor.

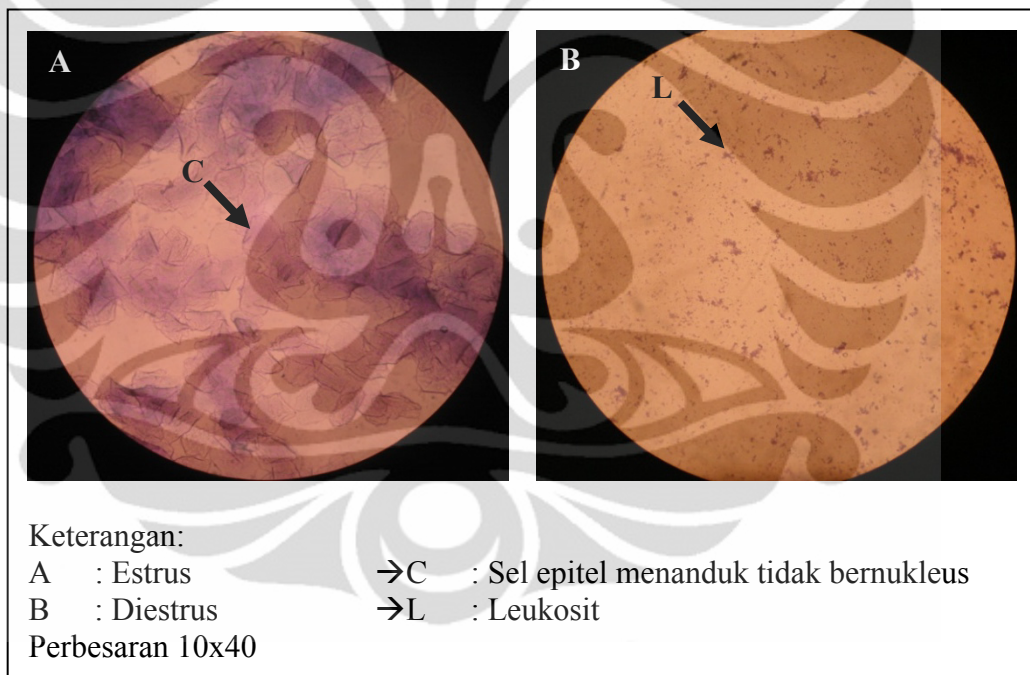
### 3.4.6 Analisis data

Sebanyak 60 buah spektrum FTIR dari sampel darah *R. norvegicus* saat estrus dan non-estrus, dikonversi ke bentuk numerik melalui Microsoft Notepad 5.1 dan diolah menggunakan Microsoft Office Excel 2007. Data numerik terdiri atas bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dari gugus fungsi senyawa dalam sampel darah beserta absorbansinya (%). Dari ribuan data numerik yang tersedia, bilangan gelombang dari gugus fungsi spesifik progesteron diidentifikasi dan ditentukan berdasarkan acuan. Nilai absorbansi dari masing-masing bilangan gelombang yang telah ditentukan kemudian dibandingkan pada saat estrus dan non-estrus, sehingga diperoleh nilai absorbansi yang merepresentasikan konsentrasi hormon progesteron selama siklus estrus. Nilai tersebut kemudian dibandingkan dengan hasil pengukuran dari analisis RIA.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Penentuan fase dalam siklus estrus melalui ulas vagina

Metode ulas vagina digunakan untuk menentukan fase dalam siklus estrus. Pengamatan mikroskopis sediaan ulas vagina menunjukkan populasi sel epitel vagina saat estrus dan diestrus (Gambar 4.1). Sediaan estrus memperlihatkan populasi sel epitel menanduk tidak bernukleus, sedangkan sediaan diestrus memperlihatkan leukosit.



Gambar 4.1. Populasi sel epitel vagina *R. norvegicus* saat estrus dan diestrus

Hasil pengamatan sesuai dengan pernyataan Warren dan Juraska (1997: 260), Marcondes (2002: 612) dan Westwood (2008: 376—380), bahwa populasi sel saat estrus dan diestrus berturut-turut adalah sel epitel menanduk tidak bernukleus dan leukosit. Ulas vagina merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menentukan fase dalam siklus estrus tikus (Maeda *dkk.* 2000:

152). Alat dan bahan yang digunakan dalam metode tersebut relatif murah dan mudah didapat (Spornitz *dkk.* 1999: 117; Lohmiller & Swing 2006: 150). Metode pengamatan genitalia tidak digunakan karena *strain R. norvegicus* yang digunakan dalam penelitian tidak memperlihatkan ciri perubahan warna dan pembengkakan genitalia selama siklus.

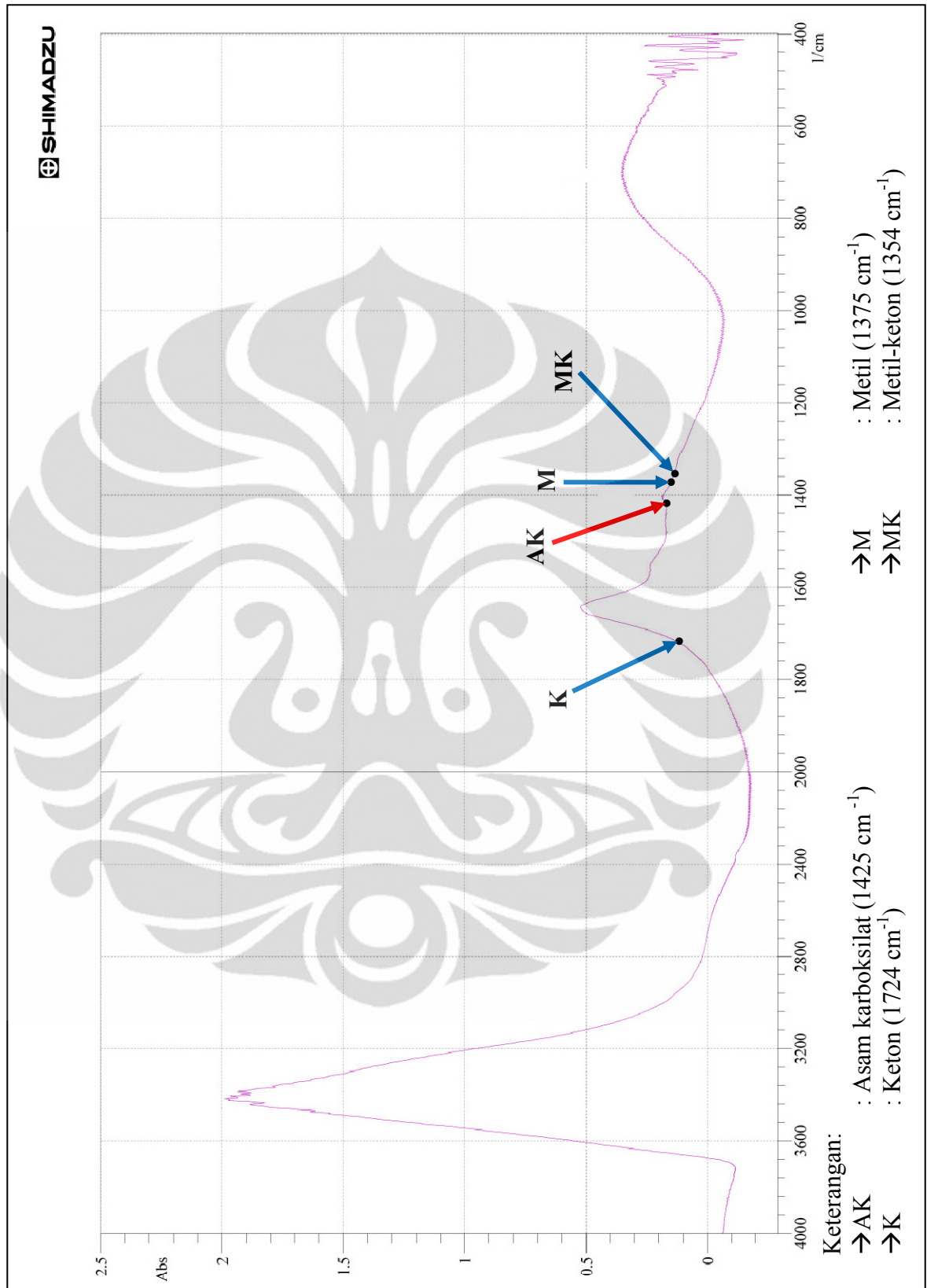
#### 4.2 Pengumpulan sampel darah

Pengumpulan sampel darah dilakukan saat *R. norvegicus* berada pada fase estrus dan diestrus (non-estrus). Emanuele *dkk.* (2003: 1) menyatakan bahwa progesteron meningkat saat diestrus dan menurun saat estrus. Berdasarkan hal tersebut, pengukuran konsentrasi progesteron pada dua fase tersebut melalui FTIR diharapkan dapat memberikan hasil yang signifikan.

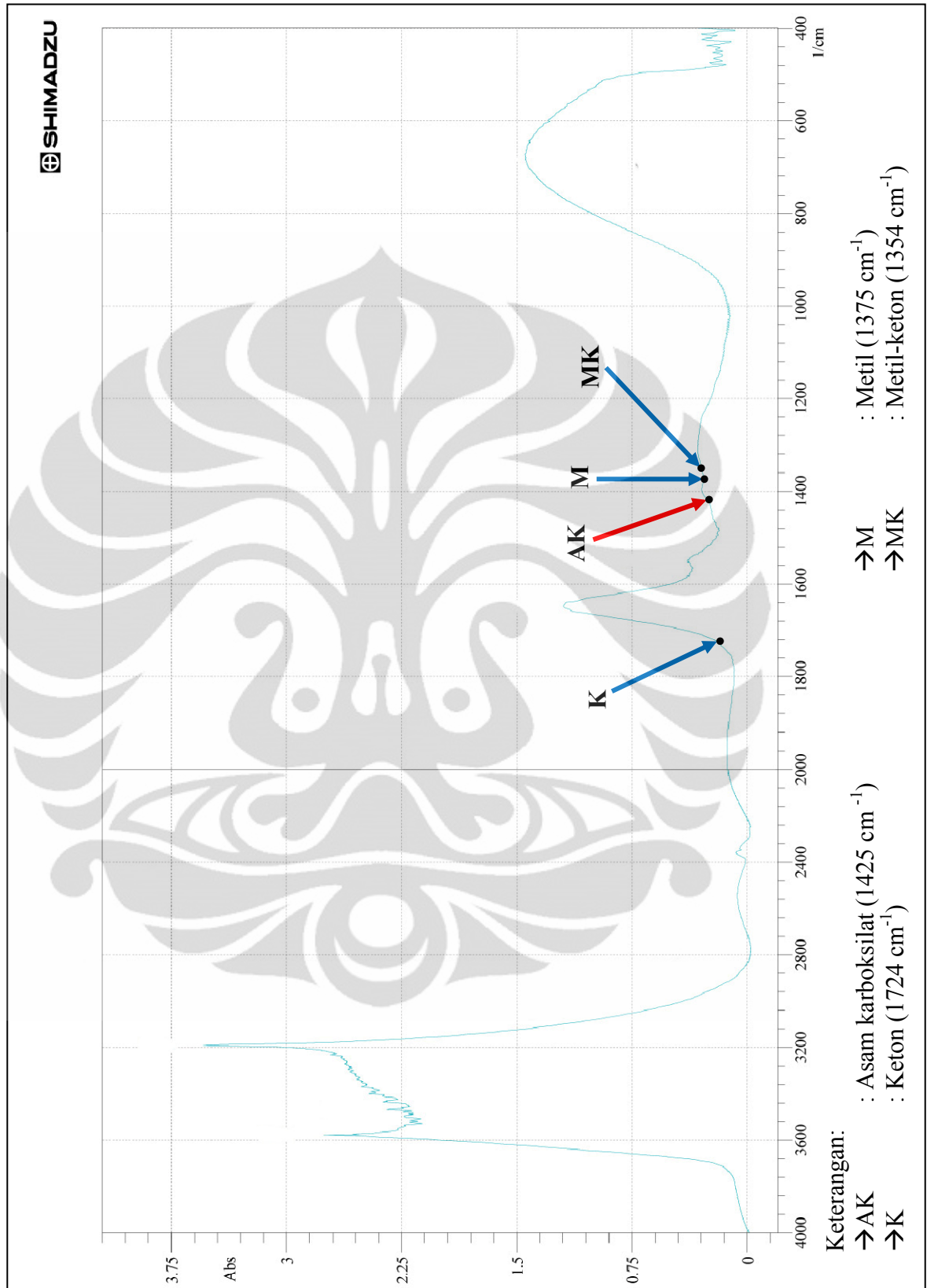
Sampel darah dikumpulkan melalui metode *tail clipping*. Metode tersebut sederhana, cepat, dan dapat digunakan untuk pengambilan sampel yang berulang (Liu *dkk.* 1996: 244). Selain itu, keterampilan khusus tidak diperlukan untuk menguasai metode tersebut. Pada tahun 1991 Sarlis (*lihat Koch 2006: 597*) melaporkan bahwa darah dalam volume yang besar (>0,5 ml) dapat diperoleh melalui metode tersebut.

#### 4.3 Analisis spektrum FTIR

Hasil analisis berupa spektrum FTIR terdiri atas frekuensi atau bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) pada sumbu X, nilai absorbansi (%) pada sumbu Y, dan sebuah kurva yang terdapat pada 400—4000  $\text{cm}^{-1}$ . Kurva tersebut memiliki banyak *peak* yang merepresentasikan gugus fungsi dari berbagai senyawa dalam darah. Gambar 4.3 (1) merupakan contoh spektrum FTIR dari sekali analisis sampel darah seekor tikus yang diambil saat estrus. Spektrum FTIR yang mirip juga diperoleh dari sampel darah non-estrus (Gambar 4.3 (2)). Spektrum FTIR dari analisis progesteron murni digunakan sebagai kontrol (Gambar 4.3 (3)).

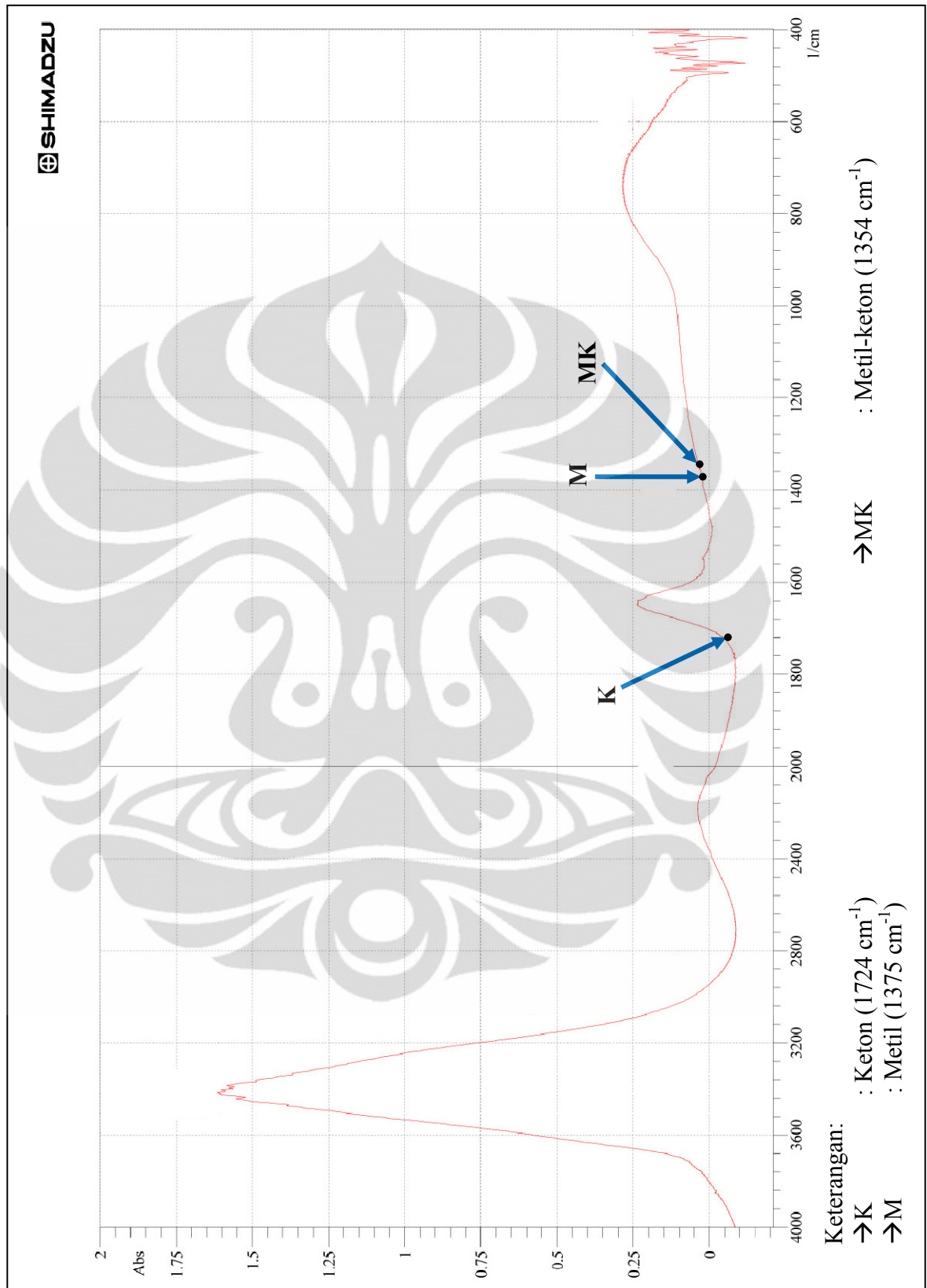


Gambar 4.3 (1). Spektrum FTIR dari darah *R. norvegicus* saat estrus



Gambar 4.3 (2). Spektrum FTIR dari darah *R. norvegicus* saat non-estrus





Gambar 4.3 (3). Spektrum FTIR dari progesteron murni

Berdasarkan prinsip kerja FTIR yang mampu mengenali gugus fungsi suatu senyawa dalam suatu sampel, progesteron (Gambar 2.5 (1)) dapat diidentifikasi melalui keton, metil, dan metil-keton (Gambar 4.3 (1), (2), dan (3)) (Nunley 2011: 1). Tiga gugus fungsi tersebut terdapat pada bilangan gelombang tertentu dengan nilai absorbansi yang bervariasi. Asam karboksilat merupakan salah satu gugus fungsi yang dimiliki hemoglobin (Gambar 2.4) (Vander *dkk.* 2001: 484.). Gugus fungsi tersebut digunakan sebagai konstanta dalam penelitian ini.

#### 4.3.1 Penentuan gugus fungsi hemoglobin

Hemoglobin (Gambar 2.4) pada spektrum FTIR dapat diidentifikasi melalui keberadaan *peak* =CH<sub>2</sub>, metil, dan asam karboksilat. *Peak* asam karboksilat tidak terdapat pada spektrum FTIR dari progesteron murni, sehingga gugus fungsi tersebut digunakan sebagai penanda hemoglobin dalam penelitian ini. Asam karboksilat terdapat di 1396—1440 cm<sup>-1</sup> pada spektrum FTIR (Smith 1979: 281—282).



Gambar 4.3.1. Nilai absorbansi asam karboksilat ( $1396\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$ )

|     | A          | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     | K     | L     | M     | N     | O     | P     | Q     | R     | S    | T     | U     | V     | W     | X     | Y     | Z     |
|-----|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 519 | 1396.46278 | 0.184 | 0.304 | 0.341 | 0.314 | 0.244 | 0.285 | 0.257 | 0.226 | 0.189 | 0.275 | 0.262 | 0.052 | 0.309 | 0.243 | 0.33  | 0.288 | 0.316 | 0.28 | 0.265 | 0.41  | 0.258 | 0.315 | 0.301 | 0.048 | 0.048 |
| 520 | 1398.3916  | 0.183 | 0.304 | 0.341 | 0.313 | 0.245 | 0.285 | 0.257 | 0.226 | 0.189 | 0.275 | 0.262 | 0.052 | 0.31  | 0.242 | 0.331 | 0.288 | 0.316 | 0.28 | 0.265 | 0.41  | 0.257 | 0.315 | 0.301 | 0.048 | 0.048 |
| 521 | 1400.32041 | 0.183 | 0.304 | 0.34  | 0.313 | 0.246 | 0.288 | 0.256 | 0.229 | 0.191 | 0.276 | 0.263 | 0.052 | 0.312 | 0.242 | 0.334 | 0.29  | 0.316 | 0.28 | 0.267 | 0.415 | 0.257 | 0.319 | 0.303 | 0.049 | 0.049 |
| 522 | 1402.24923 | 0.183 | 0.301 | 0.339 | 0.312 | 0.243 | 0.282 | 0.252 | 0.22  | 0.183 | 0.271 | 0.259 | 0.053 | 0.307 | 0.236 | 0.328 | 0.287 | 0.313 | 0.27 | 0.263 | 0.408 | 0.252 | 0.309 | 0.297 | 0.049 | 0.049 |
| 523 | 1404.17804 | 0.181 | 0.3   | 0.337 | 0.31  | 0.244 | 0.282 | 0.252 | 0.222 | 0.185 | 0.271 | 0.259 | 0.052 | 0.307 | 0.237 | 0.326 | 0.287 | 0.311 | 0.27 | 0.263 | 0.405 | 0.251 | 0.31  | 0.297 | 0.048 | 0.048 |
| 524 | 1406.10686 | 0.18  | 0.297 | 0.334 | 0.309 | 0.241 | 0.278 | 0.248 | 0.216 | 0.18  | 0.268 | 0.255 | 0.052 | 0.305 | 0.231 | 0.318 | 0.285 | 0.308 | 0.27 | 0.261 | 0.396 | 0.248 | 0.302 | 0.292 | 0.046 | 0.046 |
| 525 | 1408.03568 | 0.177 | 0.292 | 0.332 | 0.307 | 0.236 | 0.271 | 0.244 | 0.208 | 0.173 | 0.263 | 0.25  | 0.053 | 0.299 | 0.226 | 0.311 | 0.28  | 0.301 | 0.26 | 0.255 | 0.386 | 0.24  | 0.294 | 0.285 | 0.045 | 0.045 |
| 526 | 1409.96449 | 0.175 | 0.292 | 0.329 | 0.304 | 0.234 | 0.271 | 0.243 | 0.209 | 0.174 | 0.264 | 0.249 | 0.053 | 0.301 | 0.227 | 0.307 | 0.28  | 0.3   | 0.26 | 0.256 | 0.383 | 0.241 | 0.293 | 0.285 | 0.044 | 0.044 |
| 527 | 1411.89331 | 0.173 | 0.285 | 0.324 | 0.303 | 0.227 | 0.264 | 0.235 | 0.199 | 0.167 | 0.257 | 0.243 | 0.053 | 0.293 | 0.216 | 0.295 | 0.274 | 0.293 | 0.25 | 0.25  | 0.37  | 0.233 | 0.282 | 0.276 | 0.043 | 0.043 |
| 528 | 1413.82212 | 0.17  | 0.285 | 0.324 | 0.301 | 0.224 | 0.263 | 0.235 | 0.198 | 0.166 | 0.256 | 0.242 | 0.054 | 0.292 | 0.218 | 0.29  | 0.273 | 0.289 | 0.25 | 0.249 | 0.367 | 0.232 | 0.28  | 0.274 | 0.042 | 0.042 |
| 529 | 1415.75094 | 0.172 | 0.285 | 0.323 | 0.3   | 0.222 | 0.265 | 0.233 | 0.199 | 0.168 | 0.257 | 0.242 | 0.054 | 0.292 | 0.216 | 0.29  | 0.274 | 0.289 | 0.25 | 0.25  | 0.366 | 0.234 | 0.281 | 0.274 | 0.041 | 0.041 |
| 530 | 1417.67976 | 0.17  | 0.282 | 0.32  | 0.298 | 0.218 | 0.262 | 0.23  | 0.195 | 0.166 | 0.254 | 0.239 | 0.053 | 0.289 | 0.211 | 0.285 | 0.271 | 0.285 | 0.25 | 0.248 | 0.36  | 0.23  | 0.276 | 0.27  | 0.041 | 0.041 |
| 531 | 1419.60857 | 0.169 | 0.281 | 0.318 | 0.296 | 0.215 | 0.261 | 0.227 | 0.193 | 0.166 | 0.253 | 0.238 | 0.053 | 0.288 | 0.21  | 0.281 | 0.27  | 0.282 | 0.25 | 0.247 | 0.355 | 0.228 | 0.274 | 0.268 | 0.04  | 0.04  |
| 532 | 1421.53739 | 0.167 | 0.277 | 0.315 | 0.294 | 0.209 | 0.257 | 0.223 | 0.187 | 0.161 | 0.249 | 0.234 | 0.053 | 0.284 | 0.204 | 0.274 | 0.267 | 0.278 | 0.24 | 0.244 | 0.35  | 0.224 | 0.268 | 0.263 | 0.04  | 0.04  |
| 533 | 1423.4662  | 0.166 | 0.275 | 0.314 | 0.292 | 0.206 | 0.254 | 0.221 | 0.184 | 0.158 | 0.247 | 0.232 | 0.054 | 0.281 | 0.201 | 0.27  | 0.265 | 0.274 | 0.24 | 0.241 | 0.345 | 0.22  | 0.264 | 0.26  | 0.039 | 0.039 |
| 534 | 1425.39502 | 0.164 | 0.273 | 0.311 | 0.29  | 0.201 | 0.253 | 0.218 | 0.184 | 0.157 | 0.246 | 0.23  | 0.053 | 0.28  | 0.201 | 0.265 | 0.264 | 0.27  | 0.24 | 0.241 | 0.342 | 0.22  | 0.263 | 0.258 | 0.038 | 0.038 |
| 535 | 1427.32384 | 0.164 | 0.268 | 0.309 | 0.289 | 0.194 | 0.247 | 0.212 | 0.173 | 0.149 | 0.238 | 0.224 | 0.055 | 0.273 | 0.189 | 0.258 | 0.26  | 0.265 | 0.23 | 0.236 | 0.336 | 0.212 | 0.252 | 0.251 | 0.039 | 0.039 |
| 536 | 1429.25265 | 0.164 | 0.27  | 0.31  | 0.288 | 0.198 | 0.251 | 0.213 | 0.178 | 0.154 | 0.242 | 0.227 | 0.054 | 0.276 | 0.194 | 0.261 | 0.263 | 0.266 | 0.23 | 0.238 | 0.337 | 0.215 | 0.257 | 0.254 | 0.039 | 0.039 |
| 537 | 1431.18147 | 0.163 | 0.269 | 0.308 | 0.287 | 0.195 | 0.251 | 0.21  | 0.176 | 0.153 | 0.242 | 0.225 | 0.054 | 0.276 | 0.191 | 0.258 | 0.262 | 0.264 | 0.23 | 0.238 | 0.335 | 0.214 | 0.255 | 0.252 | 0.039 | 0.039 |
| 538 | 1433.11028 | 0.162 | 0.267 | 0.307 | 0.286 | 0.192 | 0.248 | 0.207 | 0.172 | 0.15  | 0.239 | 0.223 | 0.055 | 0.272 | 0.186 | 0.255 | 0.261 | 0.26  | 0.23 | 0.236 | 0.332 | 0.21  | 0.251 | 0.249 | 0.039 | 0.039 |
| 539 | 1435.0391  | 0.162 | 0.269 | 0.309 | 0.285 | 0.194 | 0.252 | 0.207 | 0.177 | 0.157 | 0.242 | 0.225 | 0.053 | 0.275 | 0.189 | 0.258 | 0.263 | 0.261 | 0.23 | 0.238 | 0.335 | 0.213 | 0.257 | 0.252 | 0.039 | 0.039 |
| 540 | 1436.96792 | 0.162 | 0.268 | 0.308 | 0.284 | 0.192 | 0.252 | 0.205 | 0.175 | 0.158 | 0.242 | 0.225 | 0.053 | 0.274 | 0.187 | 0.256 | 0.263 | 0.26  | 0.23 | 0.238 | 0.334 | 0.212 | 0.256 | 0.251 | 0.039 | 0.039 |
| 541 | 1438.89673 | 0.162 | 0.267 | 0.308 | 0.283 | 0.19  | 0.252 | 0.204 | 0.174 | 0.158 | 0.241 | 0.224 | 0.054 | 0.273 | 0.186 | 0.256 | 0.263 | 0.258 | 0.23 | 0.237 | 0.334 | 0.21  | 0.255 | 0.25  | 0.04  | 0.04  |
| 542 | 1440.82555 | 0.16  | 0.269 | 0.308 | 0.283 | 0.187 | 0.254 | 0.203 | 0.175 | 0.156 | 0.244 | 0.224 | 0.055 | 0.275 | 0.188 | 0.256 | 0.264 | 0.258 | 0.23 | 0.239 | 0.34  | 0.212 | 0.258 | 0.252 | 0.041 | 0.041 |
| 543 | 1442.75436 | 0.16  | 0.264 | 0.305 | 0.281 | 0.187 | 0.249 | 0.196 | 0.167 | 0.151 | 0.238 | 0.219 | 0.055 | 0.268 | 0.177 | 0.248 | 0.26  | 0.252 | 0.22 | 0.234 | 0.331 | 0.205 | 0.25  | 0.245 | 0.041 | 0.041 |

**Keterangan:**  
 Kolom A : Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )  
 Kolom B—K : Nilai absorbansi dari 10 ekor tikus saat estrus  
 Kolom O—X : Nilai absorbansi dari 10 ekor tikus saat non-estrus  
 Kolom L : Rerata nilai absorbansi (estrus)  
 Kolom Y : Rerata nilai absorbansi (non-estrus)  
 Kolom M : Standar deviasi (SD) (estrus)  
 Kolom Z : Standar deviasi (SD) (non-estrus)

Gambar 4.3.1 merupakan tampilan dari sebagian kumpulan data numerik yang telah diolah menggunakan Microsoft Office Excel 2007. Baris berwarna kuning menandakan bilangan gelombang asam karboksilat yang dipilih dari 1396—1440  $\text{cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang 1425  $\text{cm}^{-1}$  dipilih sebagai penanda hemoglobin karena memiliki rerata nilai absorbansi yang relatif konstan saat estrus dan non-estrus dengan standar deviasi (SD) terkecil.

Tabel 4.3.1. Nilai absorbansi asam karboksilat (1425  $\text{cm}^{-1}$ ) yang merepresentasikan hemoglobin dari 10 ekor tikus

| Estrus |                | Non-estrus |                |
|--------|----------------|------------|----------------|
| Tikus  | Absorbansi (%) | Tikus      | Absorbansi (%) |
| 1      | 0,164          | 1          | 0,280          |
| 2      | 0,273          | 2          | 0,201          |
| 3      | 0,311          | 3          | 0,265          |
| 4      | 0,290          | 4          | 0,264          |
| 5      | 0,201          | 5          | 0,270          |
| 6      | 0,253          | 6          | 0,240          |
| 7      | 0,218          | 7          | 0,241          |
| 8      | 0,184          | 8          | 0,342          |
| 9      | 0,157          | 9          | 0,220          |
| 10     | 0,246          | 10         | 0,263          |
| Rerata | 0,230          | Rerata     | 0,258          |
| SD     | 0,053          | SD         | 0,038          |

Berdasarkan Tabel 4.3.1, rerata nilai absorbansi yang relatif konstan saat estrus dan non-estrus menunjukkan bahwa nilai absorbansi hemoglobin tidak dipengaruhi oleh siklus estrus. Rerata dari nilai absorbansi 0,230 % dan 0,258 % dari Tabel 4.3.1 direrata kembali, sehingga diperoleh satu nilai absorbansi untuk hemoglobin: 0,244 %. Nilai tersebut digunakan sebagai konstanta dalam penelitian ini.

#### 4.3.2 Penentuan gugus fungsi progesteron

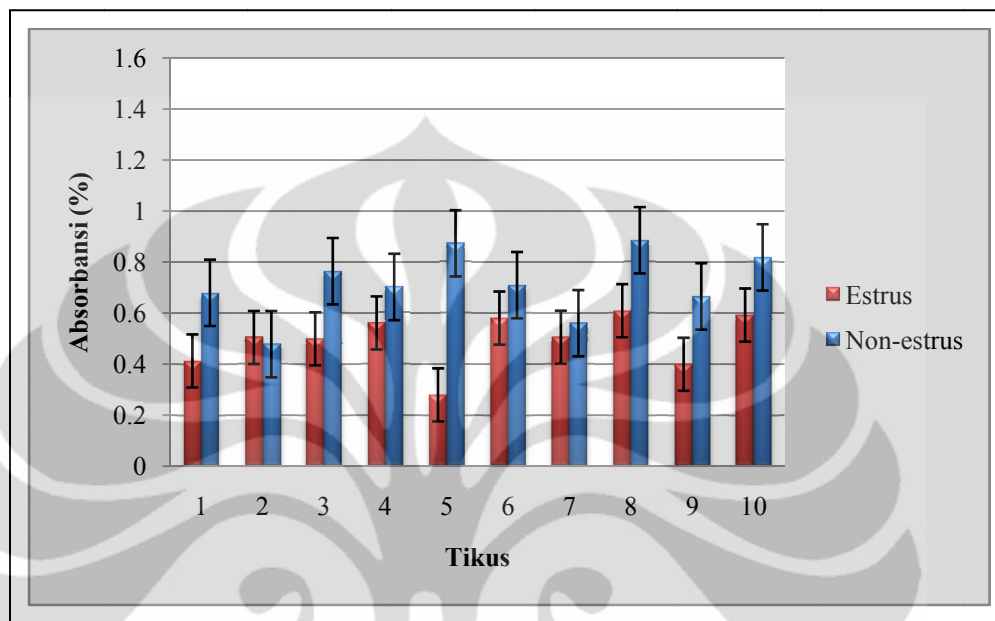
Gugus fungsi spesifik progesteron adalah keton, metil, dan metil-keton. Keton terdapat di  $1707\text{--}1726\text{ cm}^{-1}$ , metil di  $1375\text{--}1382\text{ cm}^{-1}$ , dan metil-keton di  $1350\text{--}1369\text{ cm}^{-1}$  pada spektrum FTIR (Smith 1979: 281—282). Bilangan gelombang  $1724\text{ cm}^{-1}$ ,  $1375\text{ cm}^{-1}$ , dan  $1354\text{ cm}^{-1}$  dipilih sebagai penanda progesteron karena memiliki SD yang relatif lebih kecil dibandingkan SD bilangan gelombang lainnya.

Tabel 4.3.2 (1). Nilai absorbansi gugus fungsi spesifik progesteron dari 10 ekor tikus

| Tikus  | Absorbansi (%)                   |                |                                  |                |  |                |
|--------|----------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|--|----------------|
|        | $1724\text{ cm}^{-1}$<br>(keton) |                | $1375\text{ cm}^{-1}$<br>(metil) |                | $1354\text{ cm}^{-1}$<br>(metil-keton) |                |
|        | Estrus                           | Non-<br>estrus | Estrus                           | Non-<br>estrus | Estrus                                 | Non-<br>estrus |
| 1      | 0,413                            | 0,680          | 0,715                            | 1,226          | 0,708                                  | 1,245          |
| 2      | 0,505                            | 0,479          | 1,197                            | 1,004          | 1,206                                  | 1,062          |
| 3      | 0,500                            | 0,765          | 1,326                            | 1,245          | 1,308                                  | 1,255          |
| 4      | 0,562                            | 0,703          | 1,261                            | 1,106          | 1,269                                  | 1,090          |
| 5      | 0,280                            | 0,874          | 0,954                            | 1,260          | 0,988                                  | 1,285          |
| 6      | 0,581                            | 0,710          | 1,069                            | 1,110          | 1,056                                  | 1,140          |
| 7      | 0,506                            | 0,561          | 1,060                            | 1,026          | 1,097                                  | 1,026          |
| 8      | 0,610                            | 0,886          | 0,878                            | 1,498          | 0,905                                  | 1,475          |
| 9      | 0,400                            | 0,666          | 0,710                            | 1,027          | 0,722                                  | 1,050          |
| 10     | 0,593                            | 0,819          | 1,091                            | 1,202          | 1,117                                  | 1,224          |
| Rerata | 0,495                            | 0,714          | 1,026                            | 1,171          | 1,038                                  | 1,186          |
| SD     | 0,104                            | 0,130          | 0,212                            | 0,150          | 0,209                                  | 0,139          |

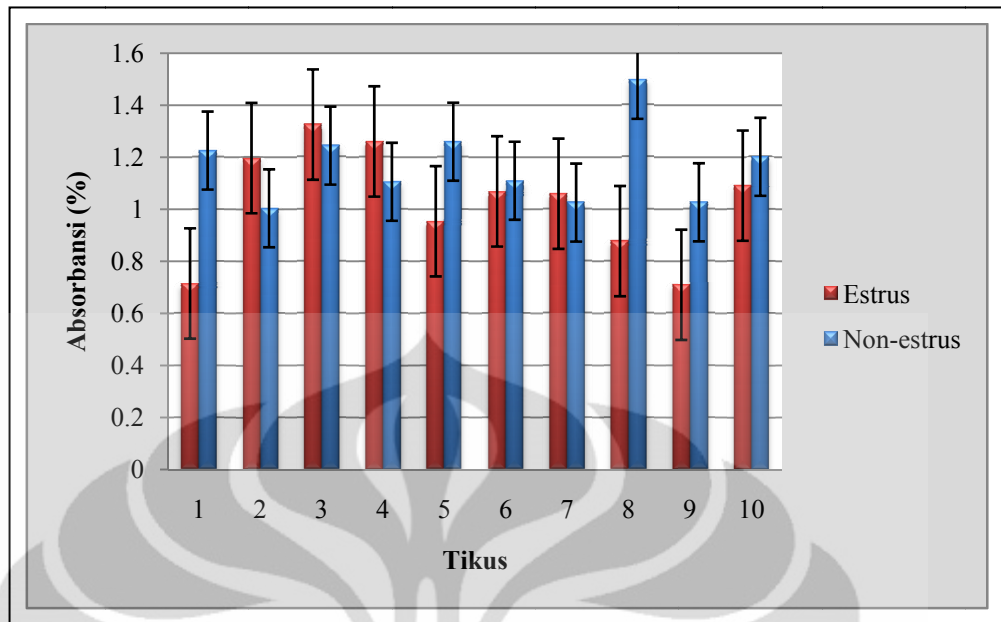
Setiap nilai absorbansi pada Tabel 4.3.2 telah direlatifkan terhadap konstanta. Berdasarkan Tabel 4.3.2, tiga gugus fungsi memiliki rerata nilai absorbansi lebih kecil saat estrus dibandingkan non-estrus. Selisih rerata nilai absorbansi yang paling signifikan antara estrus dan non-estrus terdapat pada keton

( $1724\text{ cm}^{-1}$ ). Perbandingan rerata nilai absorbansi saat estrus dan non-estrus dari setiap gugus fungsi dapat dilihat pada grafik di bawah ini.

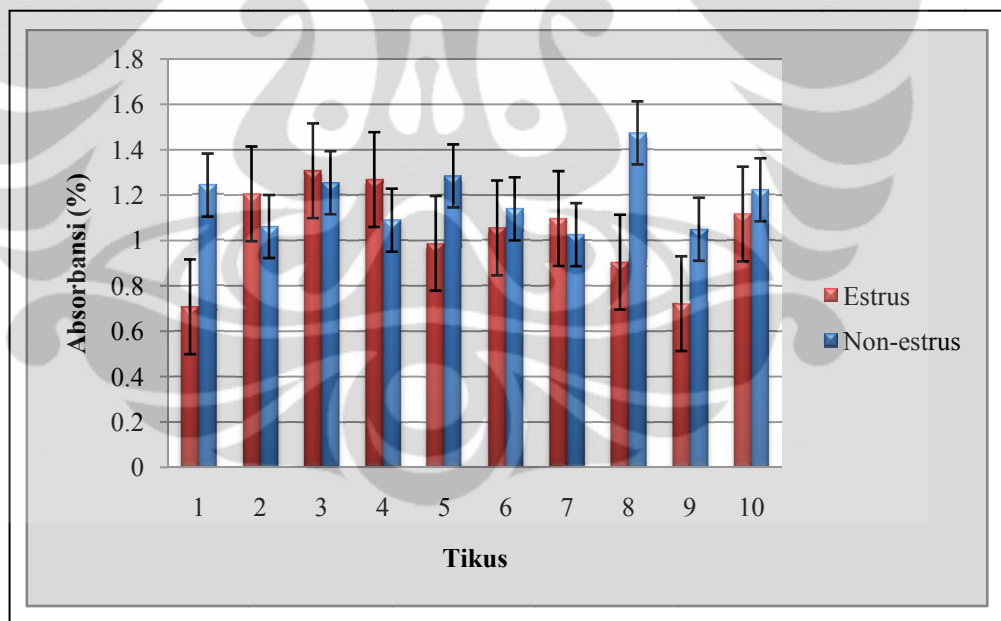


Gambar 4.3.2 (1). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif gugus fungsi keton ( $1724\text{ cm}^{-1}$ ) saat estrus dan non-estrus

Berdasarkan Gambar 4.3.2 (1), 90% dari seluruh hewan uji memperlihatkan konsentrasi keton yang berfluktuasi sesuai dengan profil progesteron selama siklus (Gambar 2.3.2). Tikus 2 tidak memperlihatkan kesesuaian seperti individu-individu lainnya. Hal tersebut dapat disebabkan oleh pengambilan sampel darah saat diestrus akhir, yaitu saat progesteron mengalami penurunan konsentrasi (Maeda *dkk.* 2000: 153)



Gambar 4.3.2 (2). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif gugus fungsi metil ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ) saat estrus dan non-estrus



Gambar 4.3.2 (3). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif gugus fungsi metil-keton ( $1354\text{ cm}^{-1}$ ) saat estrus dan non-estrus

Gambar 4.3.2 (2) dan 4.3.2 (3) memperlihatkan 50% dari seluruh hewan uji memiliki pola fluktuasi yang sesuai dengan profil progesteron selama siklus, sedangkan 50% sisanya tidak memperlihatkan kesesuaian pola. Hal tersebut dapat disebabkan oleh interferensi senyawa lain dalam darah yang juga memiliki gugus

fungsi metil dan metil-keton (Smith 1979: 223). Oleh karena itu, metil dan metil-keton dianggap tidak cukup kuat merepresentasikan progesteron dalam darah.

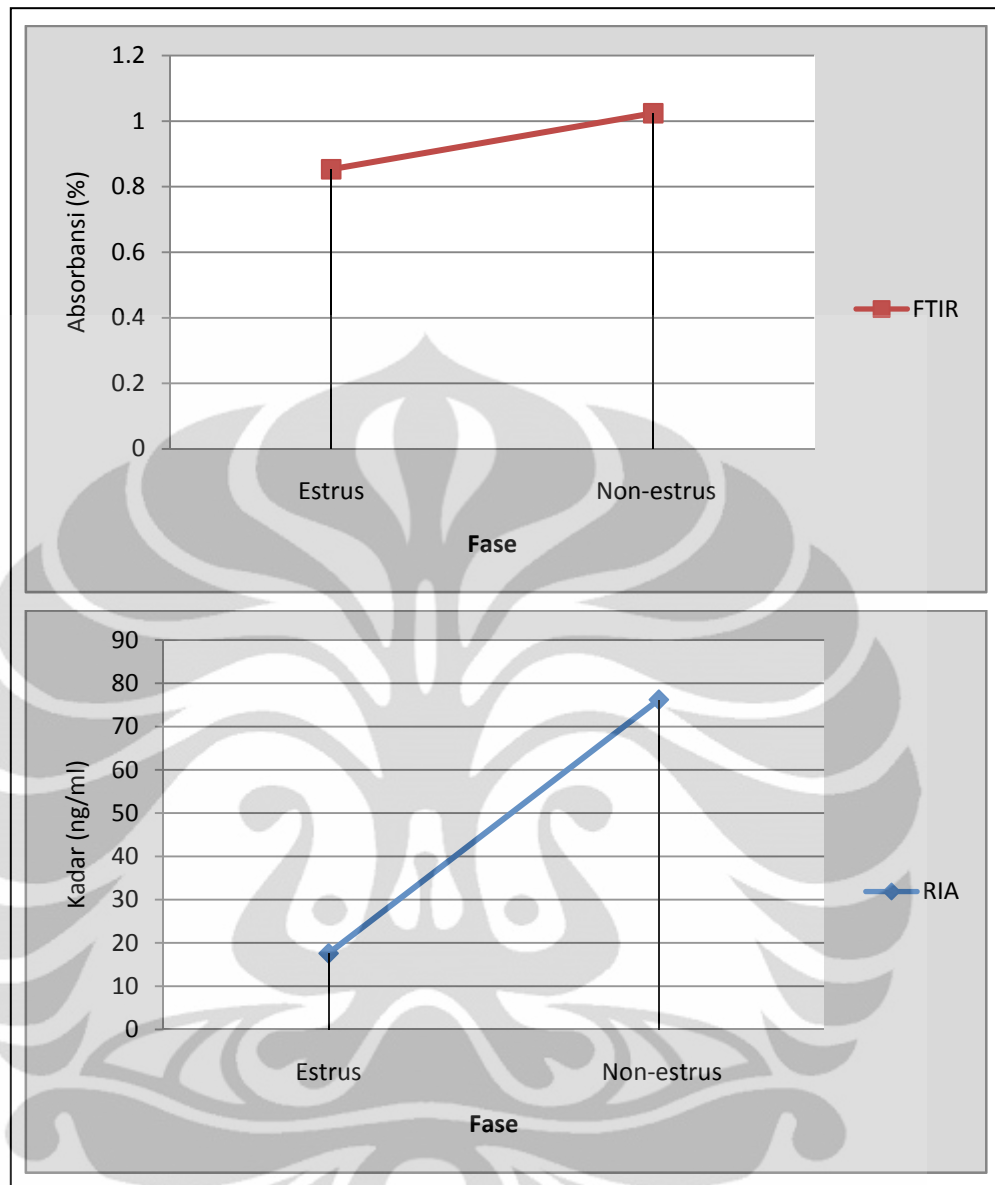
Tabel 4.3.2 (2). Ekuivalensi nilai absorbansi relatif progesteron melalui FTIR dengan konsentrasi progesteron melalui RIA

| Estrus                             |                                 | Non-estrus                         |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Absorbansi relatif progesteron (%) | Konsentrasi progesteron (ng/ml) | Absorbansi relatif progesteron (%) | Konsentrasi progesteron (ng/ml) |
| 0,853 ± 0,310                      | 17,593 ± 4,246                  | 1,024 ± 0.268                      | 76.218 ± 4.687                  |

Nilai absorbansi relatif progesteron meningkat dari 0,853 ± 0,310 % saat estrus ke 1,024 ± 0.268 % saat non-estrus. Dua nilai tersebut diperoleh dari penghitungan rerata nilai absorbansi pada Tabel 4.3.2 (1). Smith (1979: 223) menyatakan bahwa nilai absorbansi pada FTIR berkaitan erat dengan konsentrasi hormon dalam darah.

Konsentrasi progesteron dalam darah dikonfirmasi melalui metode standar pengukuran konsentrasi hormon, RIA. Hasil analisis metode RIA menunjukkan rerata konsentrasi progesteron saat estrus adalah 17,593 ng/ml, sedangkan saat non-estrus adalah 76,218 ng/ml. Hasil yang diperoleh mendekati hasil penelitian Nequin *dkk.* (1979: 666), bahwa konsentrasi progesteron dalam darah meningkat hingga 88,5 ng/ml saat diestrus dan kemudian menurun menjadi 4,4—18,2 ng/ml saat estrus. Hasil penelitian juga menunjukkan kesesuaian dengan pernyataan Emanuele *dkk.* (2003: 1), bahwa progesteron mencapai puncaknya saat diestrus dan menurun saat estrus. Berdasarkan Tabel 4.3.2 (2), 1% absorbansi relatif progesteron melalui FTIR ekuivalen dengan konsentrasi progesteron 20,625 ng/ml pada melalui RIA.





Gambar 4.3.2 (4). Grafik ekivalensi nilai absorbansi relatif progesteron melalui FTIR dengan konsentrasi progesteron melalui RIA

Hasil analisis FTIR dan RIA memperlihatkan kemiripan pola fluktuasi progesteron selama siklus. Dengan demikian, kedua metode tersebut mampu mengukur konsentrasi hormon reproduksi secara akurat.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Progesteron diwakili dengan baik oleh oleh keton di  $1724 \text{ cm}^{-1}$  dengan nilai absorbansi saat estrus dan non-estrus berturut-turut  $0,495 \pm 0,104 \%$  dan  $0,714 \pm 0,130 \%$
2. Hasil analisis FTIR dan RIA memperlihatkan kemiripan pola fluktuasi progesteron selama siklus.

#### **5.2 Saran**

Penelitian lebih lanjut menggunakan cairan tubuh selain darah diperlukan untuk mengonfirmasi kemampuan FTIR dalam mengukur konsentrasi progesteron.



## DAFTAR REFERENSI

- Anam, C., Sirojudin & K.S. Firdausi. 2007. Analisis gugus fungsi pada sampel uji bensin dan spiritus menggunakan metode FTIR. *Berkala fisika*. **10**(1): 79—85.
- Antibody & Beyond. 2007. Radioimmunoassay (RIA) Methods, Techniques & Protocols. 2007: 1 hlm.  
<http://www.antibodybeyond.com/applications/ria.htm>, 30 April 2011, pk. 17.30.
- Anwar, R. 2005. *Sintesis, fungsi dan interpretasi pemeriksaan hormon reproduksi*. Skripsi S1 Program Obstetri dan Ginekologi, FK UNPAD, Bandung: vii + 30 hlm.
- Bain, B.J. 2006. *Blood cell: A practical guide*. 4th ed. Blackwell Publishing Inc., Massachusetts: x + 476 hlm.
- Beimborn, V., H.L. Tarpley, P.J. Bain & K.S. Latimer. 2003. The Canine Estrous Cycle: Staging Using Vaginal Cytological Examination. 2003: 8 hlm.  
<http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/beimborn>, 30 April 2011, pk. 19.00.
- Catt, K.J. & M.L. Dufau. 1981. Hormone action: Control of target-cell function by peptide, thyroid, and steroid hormones. *Dalam*: Felig, P., J.D. Baxter, A.E. Broadus & L.A. Frohman (eds.). 1981. *Endocrinology and metabolism*. McGraw-Hill, New York: i + 1388 hlm.
- Champlin, A.K., D.L. Dorr & A.H. Gates. 1973. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biology of Reproduction*. **8**: 491—494.
- Chedrese, P.J. 2009. Introduction to the molecular organization of the endocrine/reproductive system. *Dalam*: Chedrese, P.J. (ed). 2009. *Reproductive endocrinology: A molecular approach*. Springer, New York: vii + 361 hlm.
- Dimitrova, M., D. Ivanova, I. Karamancheva, A. Milev & I. Dobrev. 2009. Application of FTIR-spectroscopy for diagnosis of breast cancer tumors. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. **44**(3): 297—300.

- Emanuele, M.A., F.D. Wezeman & N.V. Emanuele. 2003. Alcohol's effects on female reproductive function. *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA)*. **1**: 1.
- Fitrianti. 2002. Efektivitas penyuntikan prostaglandin satu kali dan dua kali untuk sinkronisasi estrus tikus putih (*Rattus sp.*). Skripsi S1 Program Kedokteran Hewan, IPB, Bogor: x + 38 hlm.
- Grant, K. 2011. Female Reproductive System. 2011: 1 hlm.  
[http://ratguide.com/breeding/anatomy/female\\_reproductive\\_system.php](http://ratguide.com/breeding/anatomy/female_reproductive_system.php), 13 Mei 2011, pk. 20.00.
- Hedrich, H.J. 2000. History, Strains, and Models. *Dalam*: Krinke, G.J. (ed). 2000. *The handbook of experimental animals: The laboratory rat*. Academic Press, London: xi + 756 hlm.
- Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy and stocks and strains. *Dalam*: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). 2006. *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier, Boston: v + 912 hlm.
- Hem, A. 2005. The biology of laboratory animals. (?). **1**: 95—102.
- Hofstetter, J., M.A. Suckow & D.L. Hickman. 2006. Morphophysiology. *Dalam*: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). 2006. *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier, Boston: v + 912 hlm.
- Houwen, B. 2000. Blood film preparation and staining procedures. *Laboratory hematology*. **6**: 1—7.
- Johnson, E.K. 1991. *Histology and cell biology*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore: xiii + 409 hlm.
- Johnson, M.H. & B.J. Everitt. 2000. *Essential reproduction*. 5th ed. Blackwell Science, Malden: v + 285.
- Kleiner, O., J. Ramesh, M. Huleihel, B. Cohen, K. Kantarovich, C. Levi, B. Polyak, R.S. Marks, J. Mordehai, Z. Cohen & S. Mordechai. 2002. A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy. *BMC Gastroenterology*. **2**(3): 1—14.
- Koch, M.A. 2006. Experimental modeling and research methodology. *Dalam*: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). 2006. *The*

- laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington: vi + 912 hlm.
- Leng, S.X., J.E. McElhaney, J.D. Walston, D. Xie, N.S. Fedarko & G.A. Kuchel. 2008. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. **63**(8): 879—884.
- Lindsey, J.R. & H.J. Baker. 2006. Historical foundation. *Dalam*: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). 2006. *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington: vi + 912 hlm.
- Liu, J.Y., Diaz, T.G., Vadgama, J.V. & Henry, J.P. 1996. Tail sectioning: a rapid and simple method for repeated blood sampling of the rat for corticosterone determination. *Laboratory Animal Science*. **46**: 243—245.
- Lloyd, R.S. 1952. The vaginal smear technique: a critical review of its present status in the practice of medicine. *Journal of the National Medical Association*. **44**(1): 15—21.
- Lohmiller, J.J., S.P. Swing. 2006. Reproduction and breeding. *Dalam*: Suckow, M.A., S.H. Weisbroth & C.L. Franklin (eds.). 2006. *The laboratory rat*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Burlington: vi + 912 hlm.
- Maeda, K., S. Ohkura & H. Tsukamura. 2000. Physiology of reproduction. *Dalam*: Krinke, G.J. (ed). 2000. *The handbook of experimental animals: The laboratory rat*. Academic Press, London: xi + 756 hlm.
- Mandl, A.M. 1951. The phases of the estrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*. **28**: 575—584.
- Marcondes, F.K., F.J. Bianchi & A.P. Tanno. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. **62**(4A): 609—614.
- Maryam, R. 2007. Metode deteksi mikotoksin. *Jurnal mikrobiologi kedokteran Indonesia*. **7**(1—2): 12—24.
- McKerns, K.W. 1969. *Steroid hormones and metabolism*. Appleton-Century-Crofts, New York: vii + 176 hlm.
- Molina, P.E. 2010. *Endocrine physiology*. 3rd ed. McGraw-Hill Companies Inc., New York: xii + 271 hlm.

- Mudzakir, A. 2008. *Praktikum kimia anorganik (KI 425)*. Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI, Bandung: 90 hlm.
- Nalbandov, A.N., 1990. *Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas*. Ed ke-3. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta: xv + 378 hlm.
- Nequin, L.G., Alvarez, J. & Schwartz, N.B. 1979. Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biology of Reproduction*. **20**: 659—70.
- Nunley, M. 2011. Progesterone - The Great Mediator. 2011: 1 hlm. <http://marshanunleymd.wordpress.com/>, 30 April 2011, pk. 20.00.
- O'Connor, K.A., E. Brindle, D.J. Holman, N.A. Klein, M.R. Soules, K.L. Campbell, F. Kohen, C.J. Munro, J.B. Shofer, B.L. Lasley & J.W. Wood. 2003. Urinary estrone conjugate and pregnanediol 3-glucuronide enzyme immunoassays for population research. *Clinical chemistry*. **49**(7): 1139—1148.
- Petibois, C., G. Cazorla, A. Cassaigne & G. Deleris. 2001. Plasma protein contents determined by fourier-transform infrared spectrometry. *Clinical chemistry*. **47**(4): 730—738.
- Renuga Devi, T.S., Gunasekaran, S., Wesley Hudson, J & Sarone Angelah Joybell, I. 2009. Analysis on renal failure patients blood samples: characterization and efficacy study. *Indian Journal of Science and Technology*. **2**(2): 46—50.
- Rintoul, L., H. Panayiotou, S. Kokot, G. George, G. Cash, R. Frost, T. Bui & P. Fredericks. 1998. Fourier transform infrared spectrometry: A versatile technique for real world samples. *Analyst*. **123**: 571—577.
- Rogers, K. 2011. *The reproductive system*. Encyclopedia Britannica Inc., New York: x + 265 hlm.
- Rosner, W. 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: Recent advances. *Endocrine reviews*. **11**: 81—90.
- Ross, M.H., G.I. Kaye & W. Pawlina. 2002. *Histology: A text and atlas*. 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore: x + 875 hlm.

- Semiadi, G., R.T.P. Nugraha & R.S. Tanty. 2005. Pengembangan teknik ekstraksi hormon reproduksi pada hidupan liar dengan cara *non-invasive method*. *Zoologi LIPI*. **1**: 860—877.
- Sharp, P.E. & M.C. La Regina. 1998. *The laboratory rat*. CRC Press, Boston: v + 203 hlm.
- Shefrin, D.K. 2008. Utilization of the Maturation Index from a Pap Smear. 2008: 2 hlm. <http://www.drshefrin.com/utilizationMaturationIndex.htm>, 12 Maret 2011, pk. 19.30.
- Sjahfirdi, L., F.D. Suyatna & M. Nasikin. 2010. Development of blood reproductive hormones test using FTIR to monitor phases in mammals reproductive cycle: A preliminary study. *Dalam*: Institut Teknologi Sepuluh Nopember. 2010. *International seminar on fundamental & application of chemical engineering*. ITS Press, Surabaya: A 001 + J 019 hlm.
- Smith, A.L. 1979. *Applied infrared spectroscopy: Fundamentals, techniques, and analytical problem-solving*. John Wiley & Sons, Inc., Canada: v + 322 hlm.
- Stanley, J. 2002. *Essentials of immunology & serology*. Thomson Learning, Inc., Australia: v + 376 hlm.
- Stavisky, R., E. Russell, J. Stallings, E.O. Smith, C. Worthman & P.L. Whitten. 1995. Fecal steroid analysis of ovarian cycles in free-ranging baboons. *American Journal of Primatology*. **36**: 285—297.
- Suseno, E.J. & K.S. Firdausi. 2008. Rancang bangun spektroskopi ftir (*fourier transform infrared*) untuk penentuan kualitas susu sapi. *Berkala fisika*. **11**(1): 23—28.
- Thermo Nicolet. 2001. *Introduction to fourier transform infrared spectrometry*. Thermo Nicolet Corporation, Madison: 1—8 hlm.
- Warren, S.G & J.M. Juraska. 1997. Spatial and non spatial learning across the rat estrous cycle. *Behavioral Neuroscience*. **111**(2): 259—266.
- Weiss, J., G.R. Taylor, F. Zimmermann & K. Nebendahl. 2000. Collection of body fluids. *Dalam*: Krinke, G.J. (ed.). 2000. *The handbook of*

*experimental animals: The laboratory rat*. Academic Press, London: xi + 756 hlm.

Westwood, F.R. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*. **36**: 375—384.

Ziegler, T.E., G. Scheffler, D.J. Wittwer, N. Schultz-Darken, C.T. Snowdon & D.H. Abbott. 1996. Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callithrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. *Biology of Reproduction*. **54**: 91—99.

