



UNIVERSITAS INDONESIA

**DETEKSI HORMON KORTIKOSTERON
DALAM SAMPEL URINE TIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA
MENGUNAKAN TEKNOLOGI *FOURIER TRANSFORM
INFRARED* (FTIR)**

SKRIPSI

**SHAFAR NUR AZZIS
0706264324**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**DETEKSI HORMON KORTIKOSTERON
DALAM SAMPEL URINE TIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA
MENGUNAKAN TEKNOLOGI *FOURIER TRANSFORM
INFRARED* (FTIR)**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**SHAFAR NUR AZZIS
0706264324**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Shafar Nur Azzis

NPM : 0706264324

Tanda Tangan : 

Tanggal : 20 Juni 2012




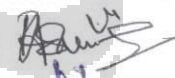


HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Shafar Nur Azzis
NPM : 0706264325
Program Studi : Biologi
Judul : Deteksi Hormon Kortikosteron dalam Sampel Urine Tikus (*Rattus norvegicus*) 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 : Dr. Abinawanto ()
Penguji II : Dr. rer.nat Mufti Petala Patria, M.Sc ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 20 Juni 2012

KATA PENGANTAR

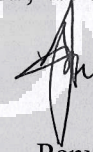
Puji syukur saya panjatkan kepada Allah S.W.T dan Nabi besar Muhammad S.A.W atas berkah dan tuntunan-Nya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini. 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).Dr. Abinawanto. dan Dr. rer.nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., selaku Penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan saran untuk perbaikan skripsi ini;
- (3).Dr. Wibowo Mangunwardoyo selaku Penasehat Akademis yang telah membimbing dan membantu saya selama masa perkuliahan;
- (4).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, Titi Soedjiarti, S.U selaku Koordinator Pendidikan Departemen Biologi FMIPA UI dan Drs. Ellyzar I.M.Adil, M.Si. (alm) Dr. Upi Chairunnisa 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;
- (5).Prof. Dr. Ir. M. Nasikin, M.Eng. yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan yang saya perlukan dalam penyusunan skripsi ini;
- (6).Keluarga tercinta, Ibu (Juwarni), Ayah (Ahmad Muchtar), Adik (M. Yunus dan Lutfiah N.F), dan *My Honey* (Erva Arfiyani) yang telah memberikan cinta, kasih sayang, dukungan, dan doa;
- (7).Kak Alvin, Mas Rasyid, Pak Jajat, Kak Ade, Niki dan teman-teman KP (Edis, Pute, Dewi, Jill, Nova, Oim) yang telah banyak membantu saya dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan;

- (8). Komunitas *L'arc-en-Ciel* Indonesia (Cielers Indonesia) dan Cielers Tangerang dan Depok, Yume wo Egaku yo, *Your are Smile, We are awake*
- (9). Kelompok "Kucogan" (Akram, Bama, Bregas, Faiz, Nur Hasan) dan segenap rekan "Blossom 07" 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, 20 Juni 2012



Penulis

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

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

Nama : Shafar Nur Azzis
NPM : 0706264324
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 Royalty Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Deteksi Hormon Kortikosteron dalam Sampel Urine Tikus (*Rattus norvegicus*)
Betina Menggunakan Teknologi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, mempublikasikan 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 : 20 Juni 2012

Yang Menyatakan :



(Shafar Nur Azzis)

ABSTRAK

Nama : Shafar Nur Azzis
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Deteksi Hormon Kortikosteron dalam Sampel Urine Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Menggunakan Teknologi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Telah dilakukan pemeriksaan hormon kortikosteron pada tikus betina (*Rattus norvegicus*) menggunakan FTIR. Penelitian bertujuan mengetahui bilangan gelombang dan nilai absorbansi gugus fungsi spesifik kortikosteron dalam urine selama siklus estrus, dan mengetahui keabsahan FTIR dalam mengukur konsentrasi hormon kortikosteron. Sampel urine dari sepuluh ekor tikus pada saat estrus dan diestrus yang ditentukan melalui ulas vagina dianalisis melalui FTIR. Diperoleh hasil 3 gugus fungsi spesifik dari kortikosteron pada masing-masing bilangan gelombangnya berturut-turut sebagai berikut alkohol (CH_2OH) pada 3552 cm^{-1} , hidroksil (OH) pada 3201 cm^{-1} dan metil (CH_3) pada 1375 cm^{-1} . Nilai absorbansi gugus fungsi spesifik kortikosteron diperoleh dan dibandingkan dengan nilai absorbansi keton (C=O), gugus fungsi spesifik dari kreatinin pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} yaitu $0,24\%$. FTIR mampu mendeteksi konsentrasi kortikosteron saat estrus pada $2,00\% \pm 0,50\%$ / % Cr dan saat non estrus pada $1,94\% \pm 0,54\%$ / % Cr. Tidak terdapat perbedaan antara kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus

Kata kunci : FTIR, kortikosteron, gugus fungsi, preparat ulas vagina, tikus, siklus estrus.
xiv + 54 halaman : 21 gambar; 3 lampiran; 6 tabel
Daftar referensi : 50 (1979--2011)

ABSTRACT

Name : Shafar Nur Azzis
Study Program : S1 Biology
Title : Detection of Corticosterone in Urine Samples of Female Rats (*Rattus norvegicus*) Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrophotometry

Research in determining corticosterone concentration on female rat (*Rattus norvegicus*) using FTIR has been conducted. The aim of this research was to determine the wavenumbers and absorbance values of corticosterone's functional groups in urine during estrous cycles, and to verify the FTIR's capability in measuring corticosterone concentration in urine. Urine samples from ten females which were taken at estrus and non estrus determined by vaginal smear, analyzed by FTIR. The results indicated three specific functional groups of corticosterone in each successive wave numbers as follows: alcohol (CH₂OH) at 3552 cm⁻¹, hydroxyl (OH) at 3201 cm⁻¹ and methyl (CH₃) at 1375 cm⁻¹. Absorbance value of specific functional groups of corticosterone are obtained and compared with absorbance values of ketone group (C = O), specific functional groups of creatinine in the wave number 1730 cm⁻¹ which is 0.24%. FTIR can detection corticosterone concentration at estrus was 2.00 % ± 0.50 % /% Cr and in non-estrus was 1.94 % ± 0.54 % /% Cr. There was no difference between corticosterone in estrus and non-estrus condition

Keywords : FTIR, corticosterone, functional groups, rat, vaginal smear, estrus cycle

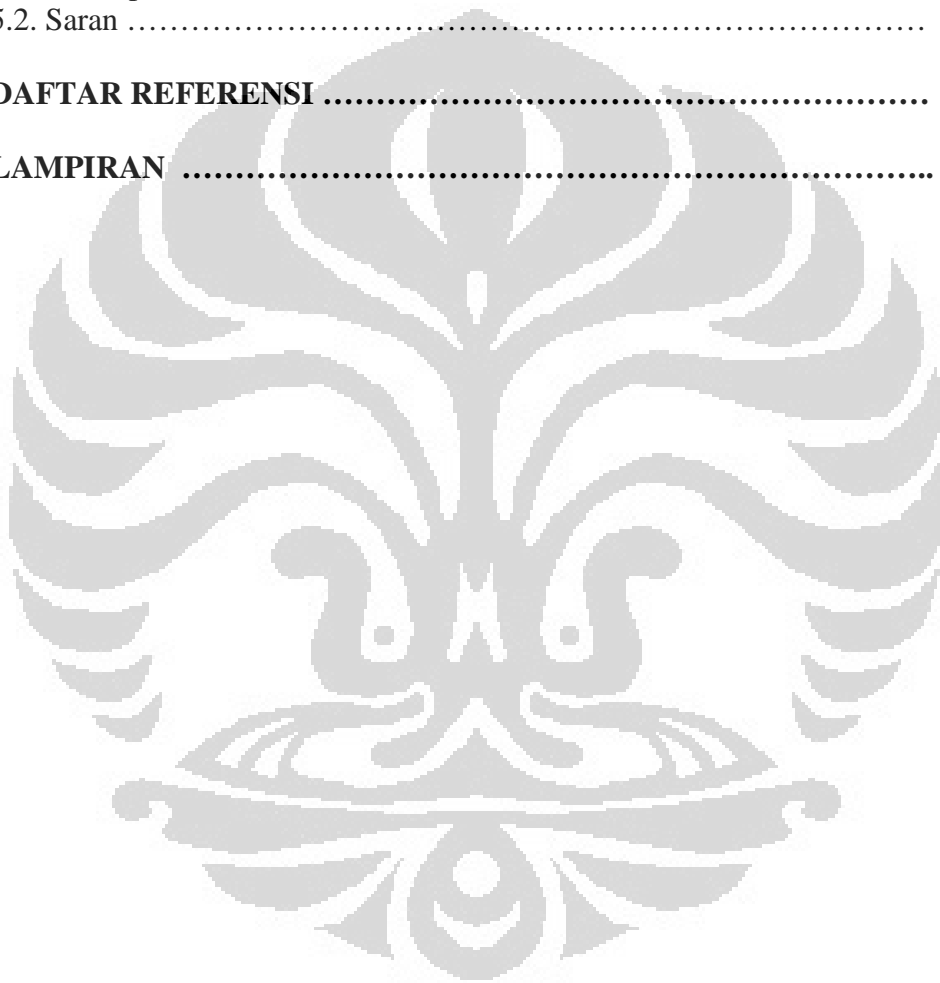
xiv + 54 pages : 21 figures; 3 attachments; 6 tables

Bibliography : 50 (1979--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
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	4
2.1.1. Klasifikasi	4
2.1.2. Tikus Albino Sebagai Hewan Uji.....	5
2.1.3. Siklus Estrus.....	6
2.2. Metode Ulas Vagina	6
2.3. Stres dan Hormon Kortikosteron	9
2.3.1. Tinjauan Stres	9
2.3.2. Respon Tubuh Terhadap Stres	9
2.3.3. Pengaruh Stres Terhadap Reproduksi Betina	10
2.3.4. Kortikosteron	12
2.4. Metode Pemantauan Kadar Kortikosteron	15
2.4.1. <i>Enzyme Immunoassay</i> (EIA)	15
2.4.2. <i>Radio Immunoassay</i> (RIA)	15
2.5. Cairan Tubuh dan Pengumpulannya	16
2.6. <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	18
2.6.1. Pengertian	18
2.6.2. Prinsip Kerja	19
2.6.3. Komponen Penyusun FTIR dan Cara Kerja Alat	22
3. METODE PENELITIAN	23
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	23
3.2. Alat dan Bahan	23
3.2.1. Alat	23
3.2.2. Bahan	23
3.3. Cara Kerja	24
3.3.1. Pemeliharaan Hewan Uji	24
3.3.2. Penentuan Fase dalam Siklus Estrus	24
3.3.3. Pengumpulan Sampel Urine	25
3.3.4. Analisis FTIR	26

3.4. Analisis Data	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1. Penentuan Fase dalam Siklus Estrus Melalui Ulas Vagina	29
4.2. Pengumpulan Sampel Urine	30
4.3. Analisis Spektrum FTIR	30
4.3.1. Penentuan Gugus Fungsi dari Kreatinin	33
4.3.2. Penentuan Bilangan Gelombang Gugus Fungsi Kortikosteron.	36
5. KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1. Kesimpulan	42
5.2. Saran	42
DAFTAR REFERENSI	43
LAMPIRAN	48

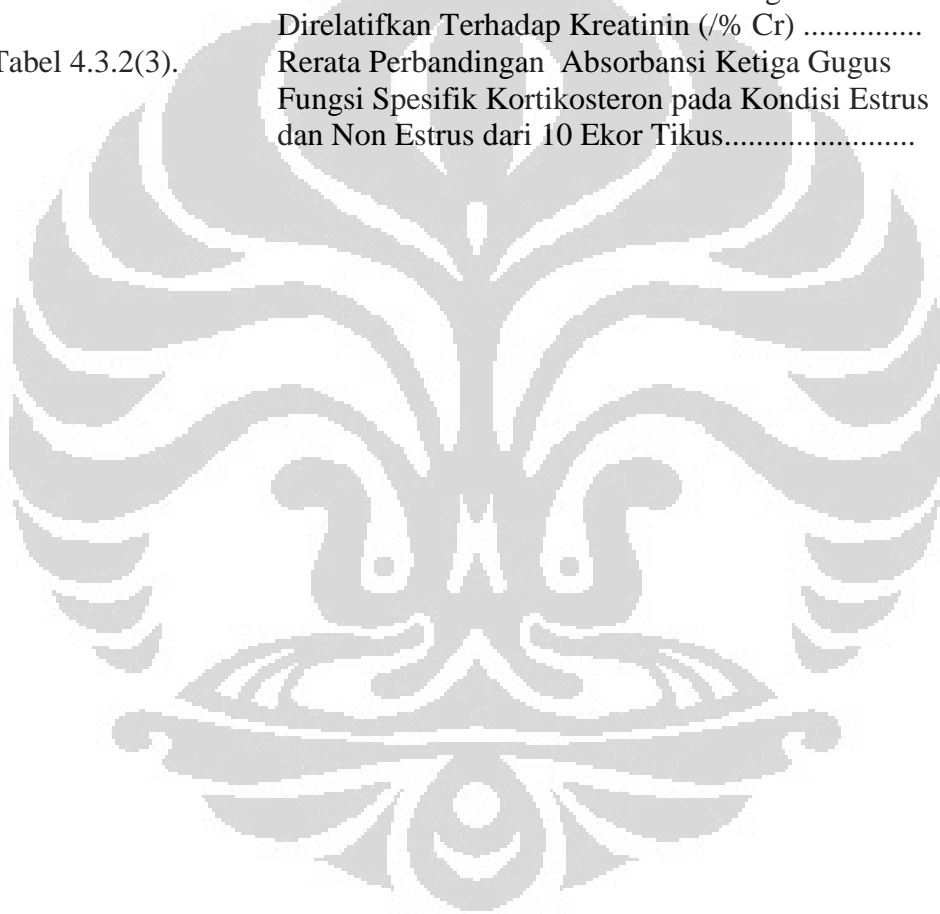


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2.	Tikus Albino Strain Sprague – Dawley	5
Gambar 2.2.	Populasi Sel Epitel Vagina <i>R. norvegicus</i> Selama Satu Siklus Estrus.....	8
Gambar 2.3.3.	Hubungan Kortikosteron dengan Sistem Reproduksi	11
Gambar 2.3.4(1).	Rumus Bangun Kortikosteron	12
Gambar 2.3.4 (2).	Jalur Sintesis Hormon Steroid Pada Korteks Adrenal.....	13
Gambar 2.3.4 (3).	Grafik Kortikosteron pada Kondisi Estrus dan Non Estrus	14
Gambar 2.5 (1).	Rumus Bangun Kreatinin	17
Gambar 2.5 (2)	Kandang Metabolit.....	18
Gambar 2.6.1.	FTIR IR Prestige-21 Shimadzu.....	19
Gambar 2.6.3.	Skema Proses Analisis Sampel pada FTIR.....	22
Gambar 3.3.2.	Penentuan Fase Siklus Estrus dengan Preparat Ulas Vagina	25
Gambar 3.3.3.	Pengambilan Sampel Urine.....	26
Gambar 3.3.4.(1).	<i>Assembly Cell</i> Yang Terdiri Atas <i>Rubber Backing</i> (1), <i>Window Znse</i> (2), <i>Cell Frame</i> (3), dan <i>Screw</i> (4).....	26
Gambar 3.3.4.(2).	Prosedur Perakitan <i>Assembly Cell</i>	27
Gambar 4.1.	Populasi Sel Epitel Vagina <i>R. norvegicus</i> Saat Estrus dan Diestrus	29
Gambar 4.3 (1).	Spektrum FTIR dari Urine <i>R. norvegicus</i> Saat Estrus	31
Gambar 4.3 (2).	Spektrum FTIR dari Urine <i>R. norvegicus</i> Saat Non-Estrus	32
Gambar 4.3.1.	Data Numerik Nilai Absorbansi Gugus Keton di Bilangan Gelombang 1730 cm^{-1} Menggunakan <i>Microsoft Excel</i>	34
Gambar 4.3.2(1).	Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif Terhadap Kreatinin Gugus Fungsi Metil (CH_3) (1375 cm^{-1}) Saat Estrus dan Non Estrus	39
Gambar 4.3.2(2).	Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif Terhadap Kreatinin Gugus Fungsi Hidroksil (OH) (3201 cm^{-1}) Saat Estrus dan Non Estrus	40
Gambar 4.3.2(3).	Grafik Perbandingan Nilai Absorbansi Relatif Terhadap Kreatinin Gugus Fungsi Alkohol (CH_2OH) (3552 cm^{-1}) Saat Estrus dan Non Estrus	40

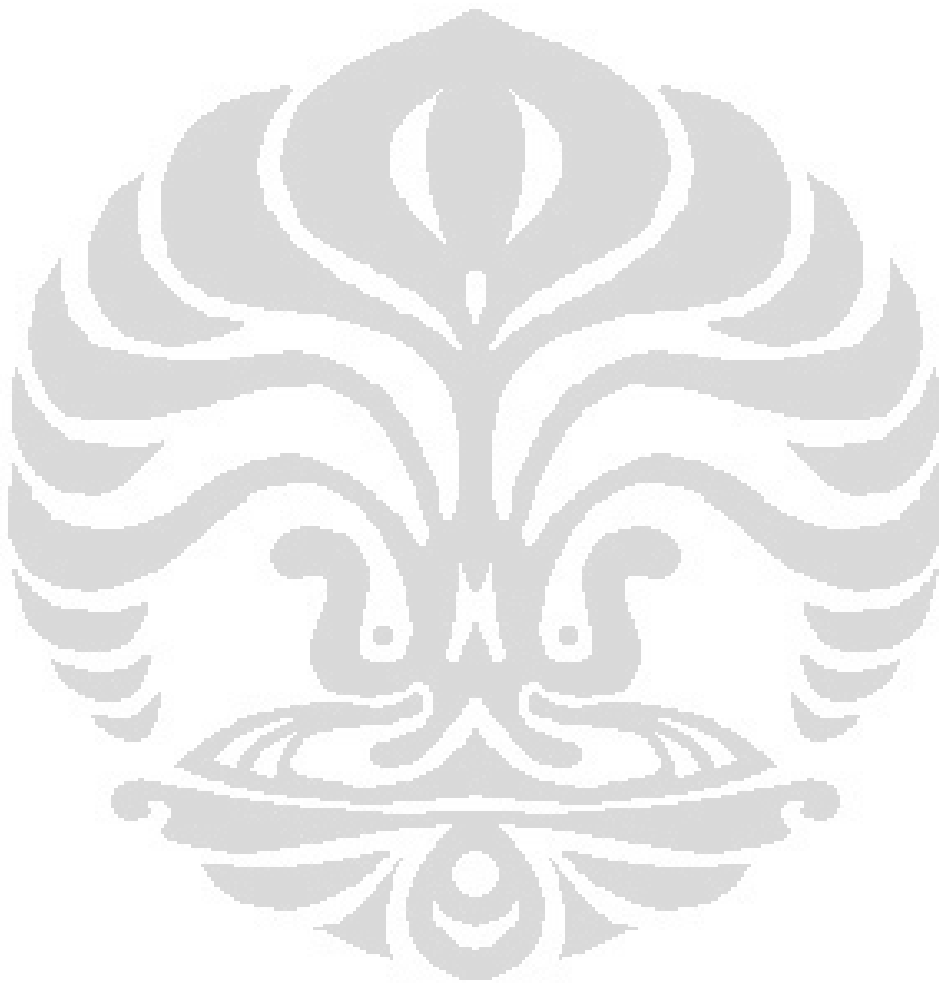
DAFTAR TABEL

Tabel 2.6.2 (1).	Tabel Korelasi Absorbansi Inframerah dan Frekuensinya	20
Tabel 2.6.2 (2).	Spektrum Senyawa Pembanding.....	21
Tabel 4.3.1.	Nilai Absorbansi Kreatinin (1730 cm^{-1}) Yang Merepresentasikan Kreatinin dari 10 Ekor Tikus ..	35
Tabel 4.3.2(1).	Nilai Absorbansi Gugus Fungsi Spesifik Kortikosteron dari 10 Ekor Tikus.....	36
Tabel 4.3.2(2).	Nilai Absorbansi Gugus Fungsi Spesifik Kortikosteron dari 10 Ekor Tikus Yang Telah Direlatifkan Terhadap Kreatinin (% Cr)	37
Tabel 4.3.2(3).	Rerata Perbandingan Absorbansi Ketiga Gugus Fungsi Spesifik Kortikosteron pada Kondisi Estrus dan Non Estrus dari 10 Ekor Tikus.....	38



LAMPIRAN

Lampiran 1	Tabel Nilai Kritis (D) Uji Kolmogorov Smirnov.....	48
Lampiran 2	Tabel Nilai t	49
Lampiran 3	Hasil Analisis Data dengan SPSS 16	50



BAB 1 PENDAHULUAN

Tingkat kemampuan suatu spesies untuk mempertahankan jenisnya ditentukan oleh kesuksesan reproduksinya. Salah satu tolok ukur kesuksesan reproduksi tersebut ialah kesuburan. Kesuburan suatu spesies sangat terkait dengan regulasi hormon reproduksi (Catt & Dufau 1981: 91; Chedrese 2009: 7). Regulasi hormon reproduksi mempengaruhi tingkat kesuburan, sehingga diperlukan pemantauan masa subur satwa betina sebagai salah satu upaya konservasi untuk mengurangi resiko kepunahan satwa endemik di Indonesia.

Salah satu penyebab berkurangnya kualitas kesuburan suatu individu disebabkan oleh faktor stres. Stres merupakan suatu respon fisiologis, psikologis dan perilaku dari suatu individu yang mencoba untuk mengadaptasi dan mengatur baik tekanan internal dan eksternal (Shugaba dkk. 2010: 72). Tubuh di saat stres akan mensekresikan hormon sebagai respon terhadap stres. Hormon tersebut berasal dari golongan glukokortikoid (kortisol dan kortikosteron) yang dihasilkan kelenjar adrenal. Jika produksi hormon tersebut berlebih maka akan menimbulkan efek pada tubuh, salah satunya pada sistem reproduksi betina yang akan mempengaruhi regulasi, perkembangan dan ovulasi dari individu betina (Brann & Mahesh 1991: 2692; Shugaba dkk. 2010: 75). Selain dilakukan pendeteksian kesuburan terhadap hormon reproduksi, perlu juga dilakukan pendeteksian tingkat stres satwa melalui pendeteksian hormon respon stres yang ikut mempengaruhi kesuburan suatu satwa.

Metode pengukuran dan pendeteksian hormon respon stres (kortisol dan kortikosteron) dapat menggunakan sampel darah yang merupakan metode invasif (menggunakan serum atau plasma) dan dapat juga menggunakan metode non invasif (menggunakan sampel urine, feses atau saliva) dengan mendeteksi metabolit dari hormon respon stres (Wudy dkk. 2007: 970--971). Pengambilan sampel melalui metode invasif sedikit banyak akan mempengaruhi tingkat stres satwa. Untuk meminimalkan tingkat stres saat ini sudah banyak dilakukan pengambilan sampel melalui metode non invasif sebagai alternatif (Monfort dkk. 1987: 832).

Keunggulan metode non invasif dibandingkan dengan metode invasif adalah lebih praktis dengan tingkat akurasi pengukuran yang sama dan metode non invasif lebih cocok digunakan pada satwa liar. Dibandingkan feses, urine memiliki keunggulan yaitu langsung dapat diukur setelah pengambilan, tidak memerlukan perlakuan ekstraksi seperti feses, dan urine juga dapat disimpan dalam suhu ruang dalam jangka waktu tertentu (O'Connor dkk. 2003: 1139--1140; Thompson dkk. 2010: 1--6).

Metode pendeteksian hormon respon stres yang umum dipakai adalah *Enzyme linked immunoassay* (EIA) dan *Radioactive immunoassay* (RIA). Kedua metode tersebut menghasilkan data yang akurat. Meski demikian kedua metode tersebut memiliki kelemahan seperti relatif mahalnya alat dan bahan yang digunakan, tidak praktis untuk sampel yang sedikit, dan terkait masa sampling, hasil analisis memiliki *expired date* yang relatif pendek. Selain itu pemakaian RIA memiliki resiko terkena dampak radiasi dari radioisotop yang bersifat destruktif (Maryam 2007: 19--21).

Terdapatnya kelemahan-kelemahan pada metode di atas, mengakibatkan perlu dicari metode alternatif lain untuk mengukur tingkat metabolit hormon respon stres sebagai penanda stres yang tidak bersifat destruktif, lebih praktis dan murah, tidak membuat satwa menjadi stres dan mampu diaplikasikan pada semua spesies. Salah satu metode alternatif yang digunakan untuk analisis sampel adalah *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Alat tersebut bekerja dengan mengenali gugus fungsi yang spesifik pada suatu senyawa.

Metode ini pernah diaplikasikan untuk mengukur kadar suatu senyawa pada suatu objek. FTIR digunakan untuk mengukur tingkat protein dalam makanan dan minuman seperti susu (Suseno & Firdausi 2008: 23), protein dan glukosa dalam plasma darah (Petibois dkk. 2001: 730) dan menganalisis sampel darah dari pasien penderita gagal ginjal (Devi dkk. 2009: 49), progesteron tikus albino (*Rattus norvegicus*) (Sjahfirdi dkk. 2011(a): 539), sedangkan untuk urine alat ini sudah digunakan untuk mengukur kadar urea dan kristal dalam urine dan kadar pregnanediol-3-glukuronida (PdG) dan estron konjugat (E₁C) (Ohnishi dkk. 2000: 299; Sjahfirdi dkk. 2011(b): 158).

Hewan uji yang sering digunakan untuk penelitian pengukuran hormon adalah tikus albino (*Rattus norvegicus*). *R. norvegicus* yang digunakan adalah strain Sprague – Dawley. Keunggulan galur Sprague – Dawley dibandingkan galur lain adalah temperamennya yang tenang dan mudah dalam penanganannya saat diberi perlakuan sehingga tikus galur ini banyak digunakan dalam penelitian yang bersifat medis (Fitrianti 2002: 5). Hormon yang diukur adalah hormon kortikosteron yang merupakan hormon glukokortikoid utama yang mengatur respon stres pada *R. norvegicus* (Norris 2007: 276).

Sampai saat ini FTIR belum pernah diaplikasikan untuk mengukur hormon kortikosteron sebagai hormon respon stres dalam urine *R. norvegicus*. Pada penelitian ini perlu dicari bilangan gelombang yang menunjukkan gugus spesifik senyawa kortikosteron tersebut, dan diperoleh nilai absorbansi dari kortikosteron dalam urine, sehingga dapat ditentukan tingkat stres satwa, kemudian membandingkan kadar kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus untuk melihat apakah ada perbedaan nilai kortikosteron antara kondisi estrus dan non estrus pada *R. norvegicus*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tikus (*Rattus norvegicus*)

2.1.1 Klasifikasi

Tikus termasuk familia Muridae dari kelompok mamalia (hewan menyusui). Para ahli zoologi (ilmu hewan) sepakat untuk menggolongkan tikus ke dalam ordo Rodentia (hewan yang mengerat), subordo Myomorpha, famili Muridae, dan sub famili Murinae. Untuk lebih jelasnya, tikus dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Sub Filum : Vertebrata
Kelas : Mammalia
Sub Kelas : Theria
Ordo : Rodentia
Sub ordo : Myomorpha
Famili : Muridae
Sub famili : Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)

(Hedrich 2000: 3--4).

Tikus yang biasa digunakan sebagai hewan uji adalah tikus albino. Tikus albino memiliki beberapa varietas yaitu galur Sprague – Dawley, Wistar dan Long – Evans. Masing – masing galur memiliki ciri yang berbeda – beda. Galur Sprague – Dawley adalah tikus albino yang memiliki kepala yang kecil dan ekor panjang melebihi panjang tubuh. Galur Wistar memiliki ciri kepala yang besar dan ekor lebih pendek dari ukuran tubuh, sedangkan galur Long – Evans memiliki ukuran lebih kecil dari galur lainnya dan memiliki ciri warna hitam pada kepala dan tubuh bagian anterior (Fitrianti 2002: 5).

2.1.2 Tikus albino sebagai hewan uji.

Tikus albino sering digunakan sebagai hewan uji karena memiliki beberapa kriteria. yaitu memiliki siklus hidup yang pendek, memiliki kemampuan reproduksi yang tinggi sehingga cocok untuk digunakan pada percobaan yang membutuhkan sampel yang besar, dan tikus juga mudah dipelihara (Hedrich 2000: 71).

Tikus albino yang umum digunakan dalam penelitian adalah dari galur Sprague - Dawley (Gambar 2.1.2) karena memiliki ciri pertumbuhan yang cepat, bertemperamen tenang, kemampuan laktasi yang tinggi, dan masa reproduksi yang cepat. Keunggulan galur Sprague – Dawley dibandingkan galur lain adalah temperamennya yang tenang dan mudah dalam penanganannya saat diberi perlakuan (Fitrianti 2002: 5).



Gambar 2.1.2. Tikus Albino Strain Sprague – Dawley

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).

2.1.3 Siklus estrus

Siklus estrus merupakan sederetan aktivitas seksual dari awal hingga akhir dan terus berulang. Panjang waktu siklus estrus pada tikus (*Rattus norvegicus*) yaitu 4 sampai 5 hari. Siklus ini dibedakan dalam 2 tahapan yaitu fase folikular dan fase luteal. Fase folikular adalah pembentukan folikel sampai ovulasi sedangkan fase luteal adalah fase setelah ovulasi sampai berakhirnya siklus dan dimulainya siklus baru jika tidak terjadi kehamilan (Lohmiller & Swing 2006: 149).

Ciri- ciri lain dari siklus estrus pada tikus adalah pada fase diestrus, lumen vagina sedikit terbuka dan jaringan berwarna ungu kebiruan. Pada fase proestrus, jaringan vagina berwarna merah muda. Pada fase estrus, vagina mirip dengan pada saat fase proestrus, namun jaringannya berwarna lebih terang dan agak kasar. Pada fase metestrus, jaringan vagina kering dan pucat (Lohmiller & Swing 2006: 150).

Perbedaan antara siklus estrus dan siklus menstruasi adalah terletak pada *external bleeding*, atau pendarahan. Pada siklus menstruasi pendarahan terjadi akibat adanya arteri spiral yang mengalami konstriksi bersamaan dengan luruhnya endometrium bagian (pars) fungsionalis. Pars basalis tidak meluruh dan permukaannya yang berbatasan dengan pars fungsionalis akan diperbaiki, sehingga pars fungsionalis beserta arteri spiral akan utuh kembali setelah beberapa waktu. Siklus estrus tidak terjadi pendarahan karena tidak adanya arteri spiral sehingga yang terjadi adalah peluruhan sel endometrium dan sel-sel yang sudah tidak dibutuhkan akan direabsorpsi. Peluruhan sel endometrium ini disebabkan karena adanya pengurangan jumlah hormon progesteron secara drastis yang dihasilkan oleh korpus luteum (Nalbandov 1990: 160--161).

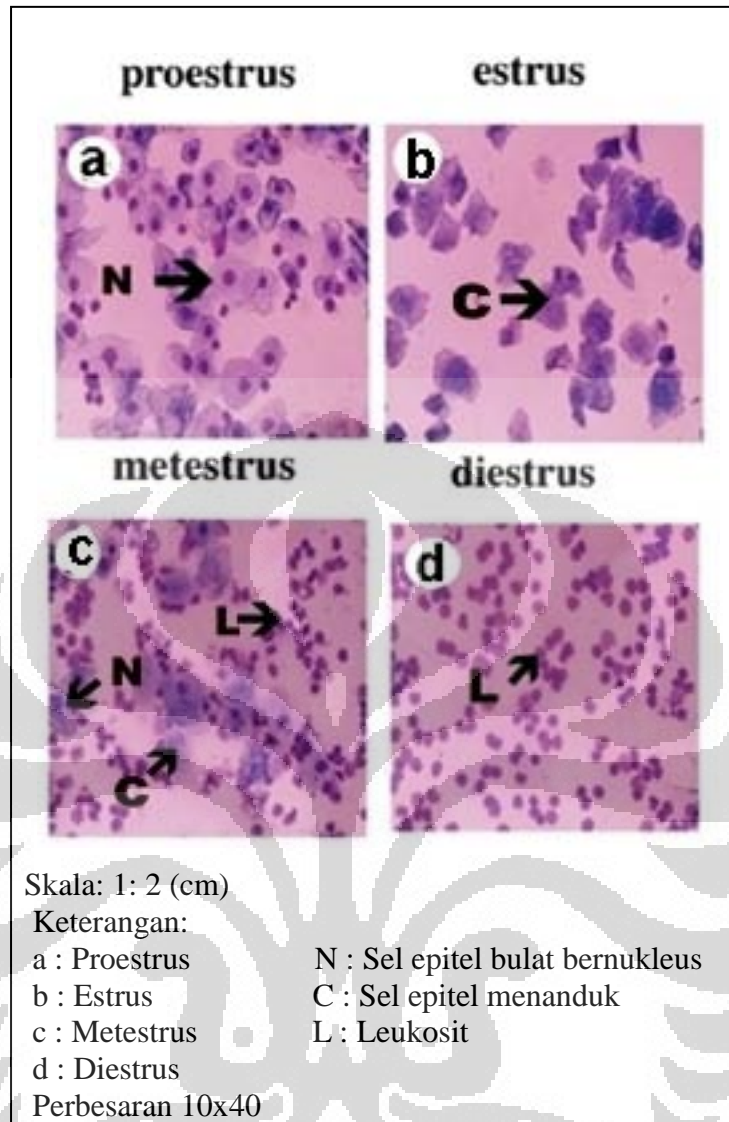
2.2 Metode ulas vagina

Metode *Smear* atau ulas, yaitu metode pembuatan preparat dengan cara mengoles atau membuat selaput tipis dari bahan yang berupa cairan atau semi cair di atas gelas objek. Metode tersebut dipakai untuk pembuatan sediaan darah,

spermatozoa, cairan hemolimf serangga, protozoa, mukosa mulut dan mukosa vagina (Bain 2006: 9--11). Pembuatan sediaan mukosa vagina dilakukan dengan mengoles sediaan mukosa vagina yang diambil dengan menggunakan *cotton bud* atau pipet ke gelas objek yang kemudian diberi pewarna (Beimborn dkk. 2003: 5).

Pewarnaan (*staining*) pada preparat ulas merupakan suatu metode persiapan dengan menggunakan kaca preparat untuk menguraikan bagian-bagian sel sehingga menghasilkan kontras pada warna agar nampak transparan dan dapat dibedakan antara satu sel dengan lainnya sesuai dengan sifat sel terhadap penyerapan warna (Jonhson 1991: 3). *Staining* merupakan pewarnaan preparat dengan cara melakukan perendaman preparat ke dalam agen pewarna. Agen pewarna tersebut misalnya: Hematoxylin & Eosin (HE), Giemsa dan lainnya. (Ross dkk. 2002: 5--6). Sebelum dilakukan pewarnaan pereparat terlebih dahulu difiksasi. Fiksasi bertujuan untuk mematikan sel tanpa merusak komponen-komponennya (Houwen 2000: 3). Contoh larutan fiksatif adalah turunan alkohol, *methylen blue*, dan sebagainya. Pewarna Giemsa digunakan untuk diagnosis malaria dan parasit. Hal tersebut disebabkan karena Giemsa spesifik terhadap gugus fosfat DNA yang mempengaruhi jumlah adenin – timin (Bain 2006: 12--14). Metode ulas vagina menggunakan pewarna Giemsa karena Giemsa dapat dengan jelas mewarnai inti sel epitel vagina sehingga dapat dibedakan populasi sel epitel vagina yang tidak berinti yang menandakan fase estrus dan populasi sel epitel vagina berinti yang menandakan fase non estrus (Beimborn dkk. 2003: 3)

Penentuan fase dan siklus estrus melalui metode ulas vagina adalah dengan dilakukan pengamatan terhadap bentuk dan populasi sel epitel vagina yang selalu berubah dari waktu ke waktu di bawah pengaruh hormon reproduksi (Maeda dkk. 2000: 154--155). Metode tersebut memiliki keunggulan yaitu alat dan bahan yang digunakan mudah didapat dan murah. Hasil yang didapat sudah mempresentasikan tahap-tahap siklus. Kelemahan metode ulas vagina jika dilakukan dalam jangka waktu lama dan berulang akan membuat hewan uji menjadi stres karena metode ulas vagina bersifat invasif.



Gambar 2.2. Populasi sel epitel vagina *R. norvegicus* selama satu siklus estrus
 [Sumber Beimbörn dkk. 2003: 3.]

Penampakan yang terjadi pada preparat ulas vagina pada siklus estrus (Gambar 2.2) dapat dibedakan menjadi 4 fase, yaitu :

1. Fase proestrus.

Ditandai dengan adanya sel-sel epitel bernukleus, jumlah leukosit sedikit, dan mitosis aktif (Gambar 2.2 a).

2. Fase estrus.

Fase ini ditandai dengan adanya sel-sel epitel menanduk (tidak bernukleus). Pada fase ini terjadi ovulasi sehingga betina siap menerima sperma dari jantan (Gambar 2.2 b).

3. Fase metestrus

Fase metestrus merupakan fase istirahat jika tidak terjadi fertilisasi atau kehamilan. Ditandai dengan sel epitel bernukleus dan sel epitel menanduk (Gambar 2.2 c).

4. Fase diestrus

Pada fase diestrus ditandai dengan adanya sel epitel bernukleus dan banyak leukosit (Gambar 2.2 d).

(Beimborn dkk. 2003: 3--5, Kustritz 2010: 6--11).

2.3 Stres dan hormon kortikosteron

2.3.1 Tinjauan stres

Stres merupakan suatu respon fisiologis, psikologis dan perilaku dari makhluk hidup yang mencoba untuk mengadaptasi dan mengatur terhadap tekanan internal dan eksternal. Sedangkan stresor adalah kejadian, situasi, seseorang atau suatu obyek yang dilihat sebagai unsur yang menimbulkan stres dan menyebabkan reaksi stres sebagai hasilnya. Stresor sangat bervariasi bentuk dan macamnya, mulai dari sumber-sumber psikososial dan perilaku seperti frustrasi, cemas dan kelebihan sumber-sumber bioekologi dan fisik seperti bising, polusi, temperatur dan gizi (Seaward 1999: 5--8).

2.3.2 Respon tubuh terhadap stres

Stres mengaktivasi otak yang berhubungan dengan komponen emosional. Respon neurologis dari otak ditransmisikan dan menstimulasi respon hormonal dari hipotalamus. Hipotalamus akan melepaskan hormon *Corticotropin-Releasing Factor* (CRF) yang menstimulasi hipofisis untuk melepaskan hormon

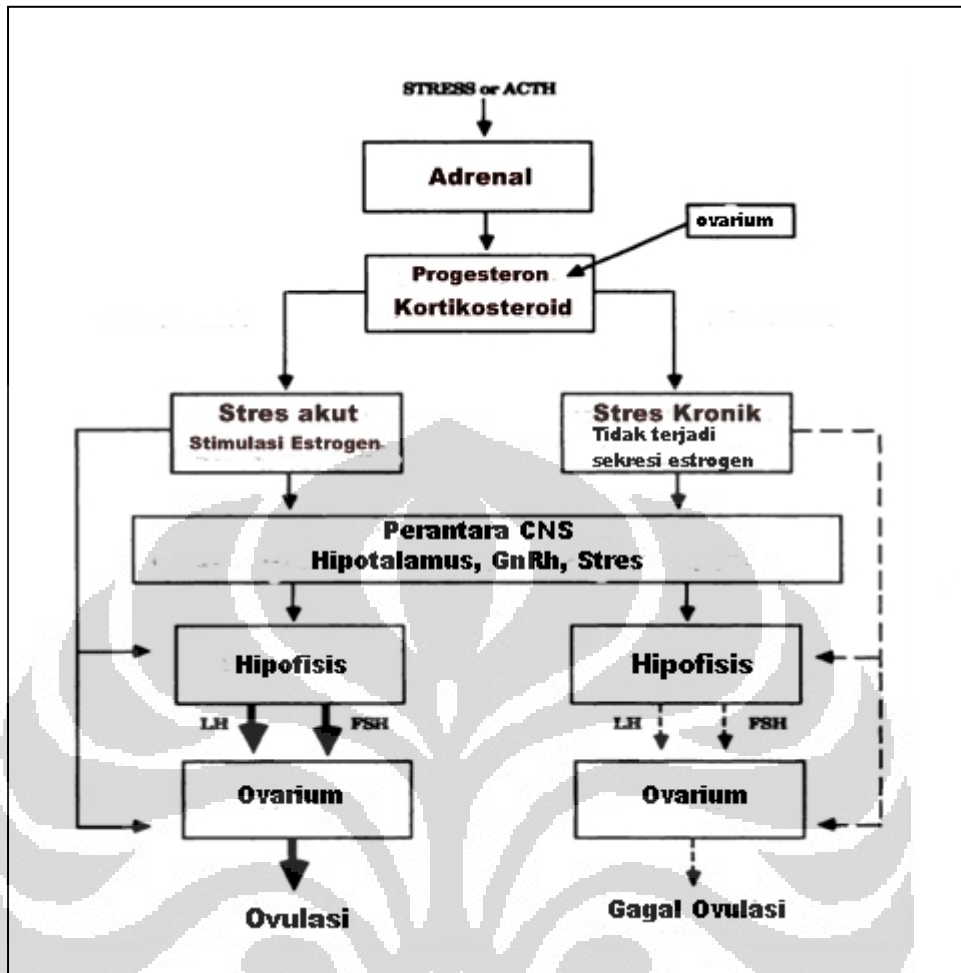
lain yaitu *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) ke dalam darah. ACTH kemudian akan menstimulasi kelenjar adrenal (Guyton & Hall 2006: 955).

Kelenjar adrenal yang terdiri dari dua daerah yang berbeda, yaitu bagian medula akan mensekresi adrenalin (epinefrin) dan noradrenalin (norepinefrin) dan lapisan luar atau korteks akan mensekresi mineralokortikoid dan glukokortikoid (Guyton & Hall 2006: 945).

Secara simultan, hipotalamus bekerja secara langsung pada sistem otonom untuk merangsang respon segera terhadap stres. Sistem otonom sendiri diperlukan dalam menjaga keseimbangan tubuh. Sistem sensorik otonom terbagi dua yaitu sistem simpatis dan parasimpatis. Sistem simpatis bertanggung jawab terhadap adanya stimulasi atau stres. Reaksi yang timbul dari sekresi glukokortikoid, kortisol pada manusia dan kortikosteron pada tikus pada sistem saraf simpatis berupa peningkatan denyut jantung, napas yang cepat, penurunan aktivitas gastrointestinal. Sementara sistem parasimpatis membuat tubuh kembali ke keadaan istirahat melalui penurunan denyut jantung, perlambatan pernapasan, meningkatkan aktivitas gastrointestinal. Rangsangan stres yang berkelanjutan terhadap sistem simpatis menimbulkan respon stres yang berulang-ulang dan menyebabkan sistem saraf tidak seimbang karena kerja sistem saraf simpatis yang terus menerus tidak diimbangi dengan kerja sistem saraf parasimpatis. Keseimbangan antara kedua sistem ini sangat penting bagi kesehatan tubuh (Seaward 1999: 27--31).

2.3.3 Pengaruh stres terhadap reproduksi betina.

Beberapa penelitian mengenai hubungan stres dengan reproduksi menyebutkan bahwa akibat dari stres yang berkelanjutan dapat menyebabkan menurunnya tingkat kesuburan. Stres kronik menyebabkan penghambatan dan menurunnya sekresi LH, menurunnya sekresi testosteron pada tikus jantan dan menghambat pematangan sel ovum pada tikus betina. Bagan dapat dilihat di gambar 2.3.3 (Brann & Mahesh 1991: 2691--2692).

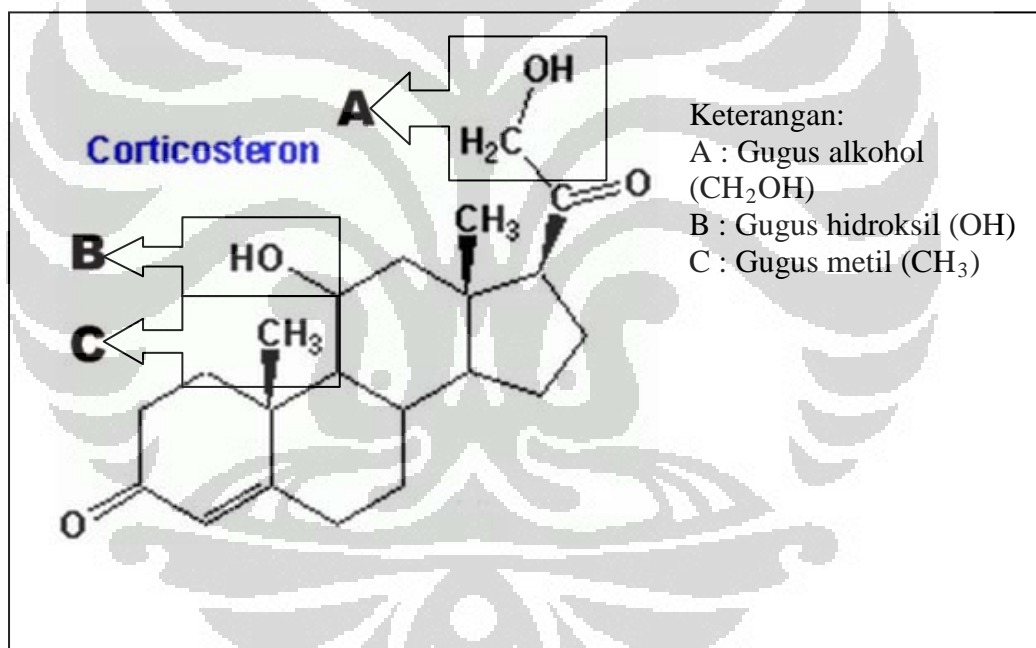


Gambar 2.3.3. Hubungan kortikosteron dengan sistem reproduksi [Sumber: Brann & Mahesh 1991: 2692.] (Telah dimodifikasi)

Gambar 2.3.3 menjelaskan bahwa saat fase folikular pada siklus estrus GnRH akan menstimulasi hipofisis untuk mensekresi LH yang akan bersama-sama FSH akan meregulasi proses pematangan folikel dan produksi hormon estrogen hingga terjadi ovulasi. Jika terjadi stres kronik maka reseptor kortikosteroid di sel granulosa ovarium yang bekerja akan menyebabkan ovarium memberikan umpan balik negatif ke hipotalamus. Akibat adanya umpan balik negatif, GnRH akan menstimulus hipofisis untuk tidak mensekresi LH dan FSH yang menyebabkan ovarium tidak bisa menghasilkan sel telur (Brann & Mahesh 1991: 2692; Dobson & Smith 2000: 748).

2.3.4 Kortikosteron

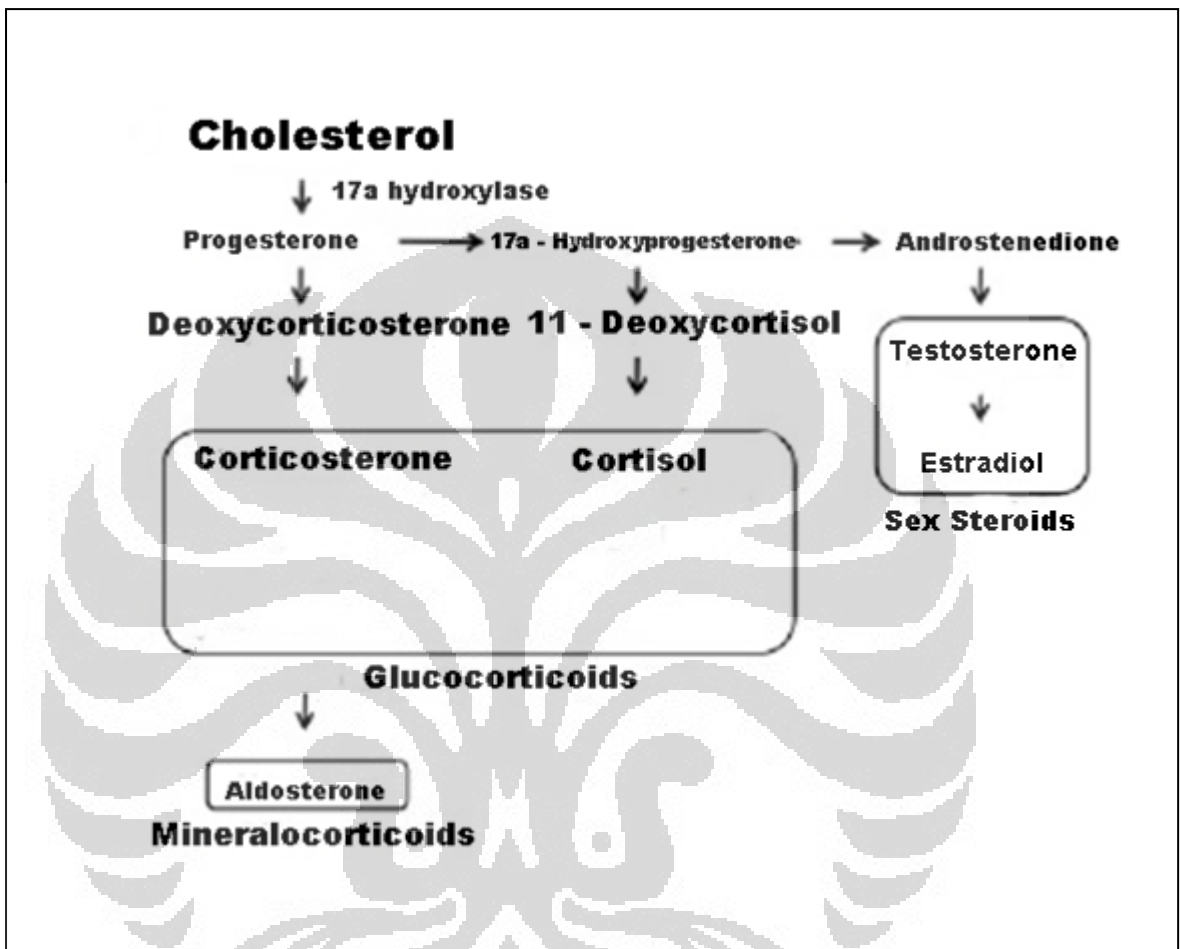
Kortikosteron merupakan hormon kortikosteroid golongan glukokortikoid dengan jumlah karbon (C) sebanyak 21 (Gambar 2.3.4) yang diproduksi oleh kelenjar adrenal bagian korteks. Pada manusia kortikosteron diproduksi di bagian korteks adrenal zona glomerulosa. Kortikosteron memiliki peran yang berbeda pada beberapa spesies. Kortikosteron pada manusia hanya merupakan hormon glukokortikoid lemah, yang hanya berperan pada jalur steroidogenik dari pregnenolon ke aldosteron. Kortikosteron di spesies lain salah satunya pada tikus merupakan hormon glukokortikoid utama yang mengatur sistem metabolisme, sistem kekebalan tubuh dan respon stres (Norris 2007: 276).



Gambar 2.3.4 (1). Rumus bangun kortikosteron
[Sumber: HMDB 2009: 1 (a).]

Kortikosteron dikendalikan oleh sumbu hipotalamus hipofisis adenocorticoid (HPA). Sumbu HPA erat kaitannya dengan sistem homeostatis hewan dan respon terhadap lingkungan. Hormon *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dilepaskan dari hipofisis anterior yang dikendalikan oleh *corticotrophin releasing hormone* (CRH) di hipotalamus, yang menyebabkan *Adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) akan menstimulasi kelenjar adrenal untuk

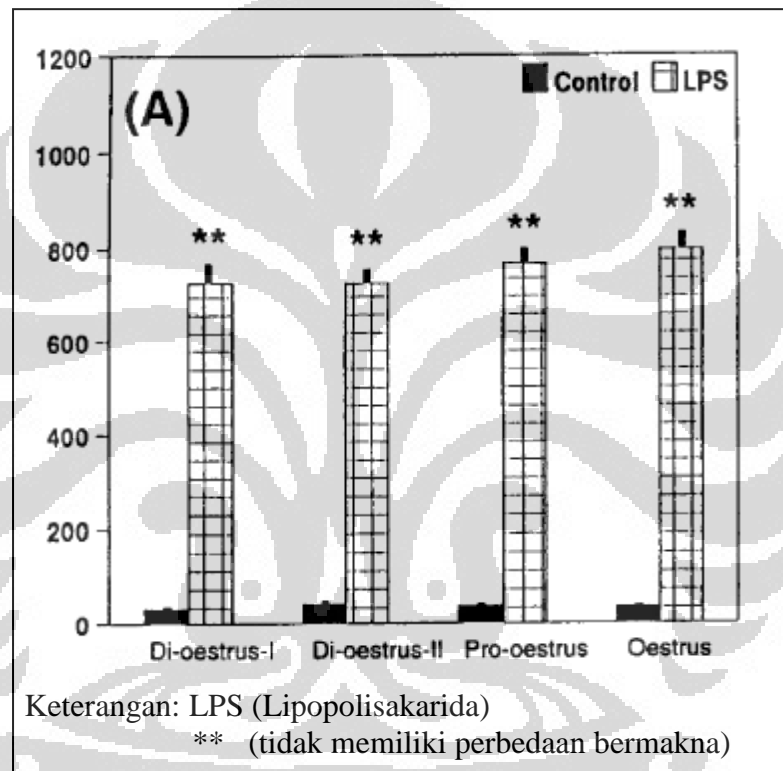
mensintesa kortikosteron. Kortikosteron kemudian mengirimkan umpan balik negatif ke hipotalamus untuk menekan pelepasan CRH dan ACTH (Guyton & Hall 2006: 956).



Gambar 2.3.4 (2), Jalur sintesis hormon steroid pada korteks adrenal
[Sumber: Hancock 2010: 17.]

Gambar 2.3.4 (2) menunjukkan jalur sintesis hormon steroid di korteks adrenal. Kortikosteron dihasilkan di zona glomerulosa yang berasal dari progesteron dan merupakan prekursor untuk pembentukan aldosteron (Guyton & Hall 2006: 947). Kadar kortikosteron yang terlalu tinggi dapat menyebabkan menurunnya tingkat kesuburan, menurunnya sistem kekebalan tubuh, degradasi otot, dan gangguan pada sistem komunikasi antarsel (Brann & Mahesh 1991: 2692--2693).

Kadar kortikosteron yang tinggi juga merupakan tanda respon terhadap stres yang menunjukkan hewan dalam keadaan stres. Kadar kortikosteron pada tikus adalah berkisar antara 150--250 ng/ml dalam darah dan dieksresikan dalam urine dan feses sebanyak 10--20 % (15--50 ng/ml) dalam bentuk kortikosteron bebas (Hancock 2010: 26). Kadar kortikosteron pada individu betina normal yang tidak mengalami stres kadarnya konstan antara saat estrus dan saat non estrus (Guo dkk. 1994:536).



Gambar 2.3.4 (3). Grafik kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus
 [Sumber: Guo dkk. 1994: 537.]

Gambar 2.3.4 (3) menunjukkan tikus kontrol pada penelitian yang dilakukan Guo dkk. (1994) memiliki kadar kortikosteron yang tidak memiliki perbedaan bermakna pada kondisi estrus dan non estrus. Setelah diberi perlakuan dengan pemberian lipopolisakarida terjadi peningkatan kortikosteron tetapi nilainya tetap konstan antara kondisi estrus dan non estrus. Kadar hormon kortikosteron untuk tikus kontrol pada penelitian tersebut berkisar antara 15--20 ng/ml.

2.4 Metode pemantauan kadar kortikosteron

2.4.1 *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).

2.4.2 *Radioimmunoassay* (RIA)

Metode radioimmunoassay (RIA) mempunyai 2 jenis prinsip yaitu kompetitif dan non kompetitif. Prinsip non kompetitif yang paling banyak digunakan adalah *sandwich*. Prinsip dasar dari *sandwich* adalah reaksi suatu antibodi dalam konsentrasi yang terbatas dengan berbagai konsentrasi antigen. Bagian dari antigen yang bebas dan terikat yang timbul sebagai akibat dari penggunaan antibodi dalam kadar yang terbatas ditentukan dengan menggunakan antigen yang diberi label radio isotop (Anwar 2005: 16).

Prinsip kompetitif memiliki prinsip dasar bahan yang mengandung antigen yang berlabel dan antigen yang terdapat di dalam sampel akan diberi label radio isotop sehingga terjadi kompetisi antara antigen yang akan ditentukan kadarnya dan antigen yang diberi label dalam proses pengikatan antibodi spesifik

tersebut sampai terjadi keseimbangan. Sisa antigen yang diberi label dan tidak terikat dengan antibodi dipisahkan oleh proses pencucian. Setelah itu dilakukan penambahan konjugat, sehingga terjadi pembentukan kompleks imun dengan konjugat. Jumlah antigen berlabel yang terikat, antibodi pada fase padat, dan konjugat dapat ditentukan dengan suatu *radiation counter* atau *gamma counter*. (Nalbandov 1990: 215--216).

Kedua metode tersebut di atas memiliki beberapa kelemahan, di antaranya harga yang relatif mahal, pemesanan membutuhkan waktu yang cukup lama, tidak efisien untuk pemakaian sampel yang sedikit, pengerjaan tidak praktis dan membutuhkan keterampilan, dan *kit* memiliki tanggal kadaluwarsa.

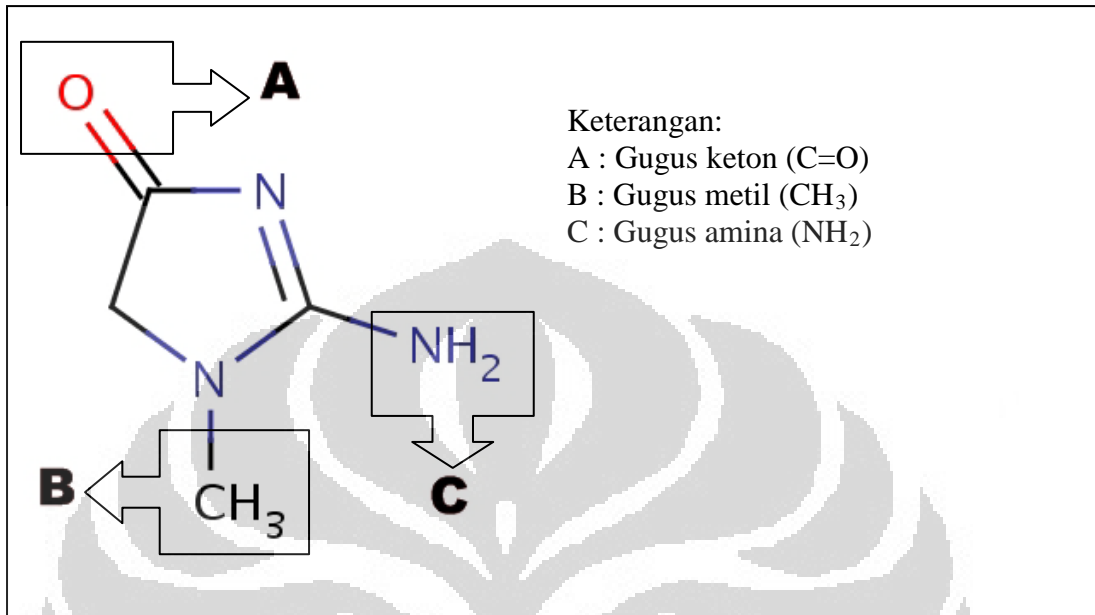
2.5 Cairan tubuh dan pengumpulannya

Cairan tubuh merupakan cairan yang terdapat di dalam tubuh manusia dan hewan yang memiliki fungsi fisiologis tertentu. Cairan tubuh adalah komponen utama yang dibutuhkan untuk analisis dalam berbagai disiplin ilmu, seperti fisiologi, farmakologi, dan toksikologi. Cairan tubuh yang umum digunakan untuk analisis yaitu air susu, urine, dan darah. Air susu, dan urine umum digunakan untuk memeriksa metabolisme dan ekskresi senyawa-senyawa tertentu. Darah diperlukan dalam penentuan tingkat pemajanan suatu bahan uji dan distribusi senyawa obat baru dalam uji praklinis (Koch 2006: 593).

Urine adalah cairan hasil ekskresi tubuh yang diproses oleh ginjal. Urine merupakan komponen penting yang dapat menggambarkan kondisi tubuh. Urine dapat menggambarkan makanan yang sudah dimakan, berapa banyak air yang terminum, dan penyakit yang diderita. Berbagai zat dan senyawa yang bersirkulasi dalam tubuh termasuk bakteri, jamur, protein, dan gula akan keluar lewat urine. Fungsi utama urine adalah membawa zat-zat toksin keluar dari tubuh agar tidak menumpuk di tubuh dan berdampak buruk bagi kesehatan (Albala dkk. 2011: 1--3).

Hasil metabolit dari tubuh yang terbuang melalui urine di antaranya adalah kreatinin. Kreatinin adalah produk turunan dari kreatin fosfat pada otot (Fischbach & Dunning 2009: 274). Kadar kreatinin tikus betina adalah berkisar

antara 64--67 mg/dl (Sumaryono dkk. 2008: 38). Rumus bangun kreatinin dapat dilihat pada gambar 2.5 (1).



Gambar 2.5 (1). Rumus bangun kreatinin
[Sumber: HMDB 2009: 1 (b).]

Gambar 2.5 (1), menunjukkan rumus bangun kreatinin yang terdiri dari beberapa gugus spesifik. Kreatinin digunakan sebagai senyawa pembanding interindividu dalam penelitian yang menggunakan sampel urine. Kreatinin digunakan sebagai senyawa pembanding interindividu karena kadarnya dianggap selalu tetap di dalam urine (tergantung massa otot) (Fischbach & Dunning 2009: 274).

Metode pengambilan sampel urine adalah dengan pengambilan urine 24 jam pada tikus dengan menggunakan kandang metabolik (Gambar 2.5.(2)) yaitu kandang yang dikonstruksi untuk dapat menampung hasil metabolit tikus berupa urine dan feses. Tikus dimasukkan dalam kandang metabolik dan hasil ekskresinya berupa urine ditampung untuk kemudian dapat dikoleksi dan dianalisis (Imelda & Andani 2006: 77).



Gambar 2.5 (2). Kandang metabolit
[Sumber: Shuzhou fengshi laboratory 2008: 1.]

2.6 *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

2.6.1 Pengertian

FTIR (Gambar 2.6.1) merupakan salah satu alat yang dipakai untuk mengidentifikasi senyawa, baik alami maupun buatan. Dalam FTIR, dua molekul senyawa dengan struktur kimia yang berbeda memiliki spektrum inframerah yang juga berbeda. Hal tersebut disebabkan oleh perbedaan jenis ikatan dan frekuensi vibrasi. Meskipun jenis ikatan sama, namun jenis senyawa berbeda, frekuensi vibrasi yang dihasilkan juga berbeda, sehingga spektrum inframerah pada FTIR merupakan sidik jari dari suatu molekul (Smith 1979: 3 & 123).



Gambar 2.6.1 FTIR IRPrestige-21 Shimadzu

2.6.2 Prinsip kerja

Jika sinar inframerah dilewatkan melalui sampel senyawa organik, maka terdapat sejumlah frekuensi yang diserap dan ada yang diteruskan atau ditransmisikan. Serapan cahaya oleh molekul tergantung pada struktur elektronik dari molekul tersebut (Suseno & Firdausi 2008: 23).

Molekul yang menyerap energi tersebut akan mengalami perubahan energi vibrasi dan perubahan tingkat energi rotasi. FTIR akan mendeteksi suatu sampel pada tingkat gugus fungsi. Ikatan-ikatan yang berbeda seperti C-C, C=C, C≡C, C-O, C=O, O-H serta NH mempunyai frekuensi karakteristiknya sebagai pita serapan dalam spektrum inframerah. Ikatan-ikatan tersebut akan terbaca pada bilangan gelombang yang berbeda – beda sesuai dengan pita serapan dalam spektrum inframerah (Suseno & Firdausi 2008: 24).

Hasil analisa dari FTIR adalah sebuah grafik absorbansi yang terdiri dari nilai absorbansi pada sumbu Y dan bilangan gelombang cm^{-1} atau frekuensi pada sumbu X. Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorbansi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel

korelasi (Tabel 2.6.2 (1)) dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui) (Tabel 2.6.2 (2)) (Anam dkk. 2007: 83).

Tabel 2.6.2 (1). Tabel korelasi absorbansi Inframerah dan frekuensinya

Gugus fungsi	Jenis vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
NH ₂	Asym. Stretching	3400-3300
	Sym. Stretching	3300-3250
	Bending	1650-1550
NHR	Stretching	3500-3200
OH	Stretching	3600-3200
CH (sp)	Stretching	3350-3250
CH (sp ²)	Stretching	3100-3000
CH _x (sp ³)	Stretching	2990-2850
	Bending	1475-1350
BH	Terminal Stretching	2650-2250
	Bridging Stretching	2200-1500
PH	Stretching	2450-2280
C=O	Stretching	1850-1650
P=O	Stretching	1300-1175
P-O	Stretching	1100-900
BN	Stretching	1275-1175

[Sumber: Mudzakir 2008: 77.]

Tabel 2.6.2 (2) Spektrum senyawa pembandingan

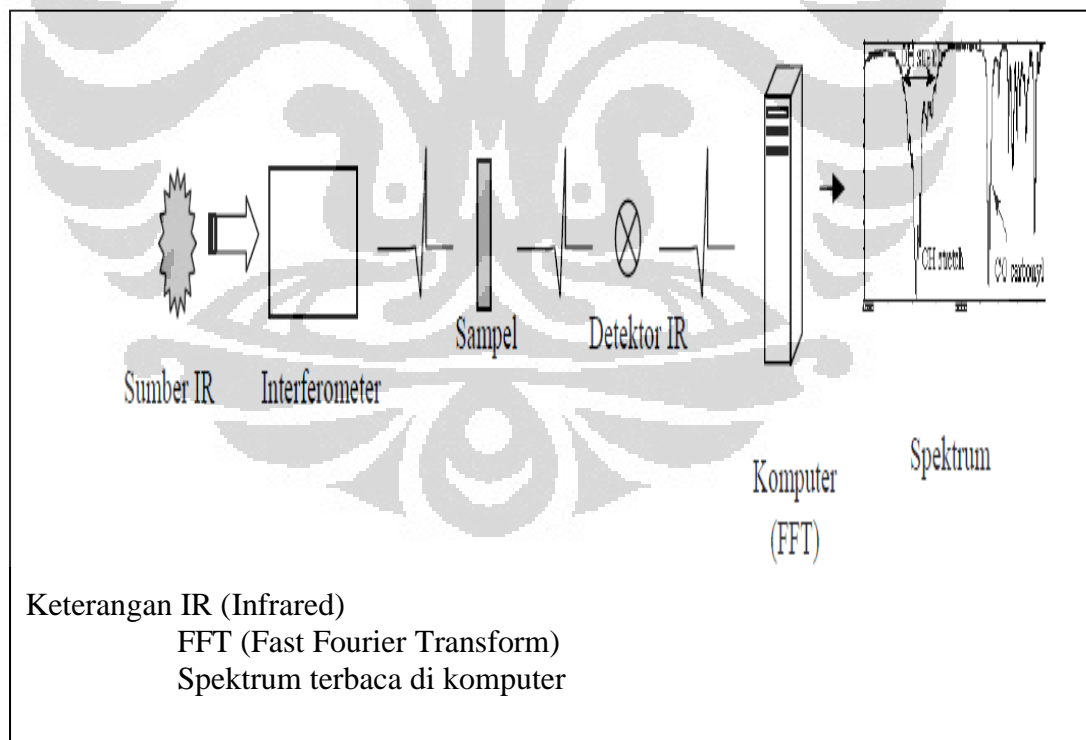
Gugus fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
Alkil C-H (stretching) Isopropil-CH (CH ₃) ₂ Tert-Butil-C(CH ₃) ₃ -CH ₃ (Bending) -CH ₂ (Bending)	2853-2962 1380-1385 1365-1370 1385-1395 dan 1365 1375-1450 1465
Alkenil C-H (Stretching) C=C (Stretchingg keluar bidang) R ₂ C=CH ₂ Cis-RCH=CHR Trans-RCH-CHR	3010-3095 1600-1680 985-1000 905-920 880-900 675-730 960-975
Alkuniil =C-H (stretching) C=C (stretching)	3300 2100-2250
Aromatik C=C Ar-H (stretching) Substitusi aromatik (C-H bending keluar bidang) Mono Orto Meta Para	1475 dan 1600 3030 690-710 730-770 735-770 680-725 750-810 790-840
Alkohol, Fenol, Asam Karboksilat OH (alkohol, fenol) Alkohol, fenol, ikatan hidrogen OH (asam karboksilat, ikatan hidrogen)	3590-3650 3300-3600 2400-3400
Aldehida, Keton, Ester, dan Asam Karboksilat C=O (stretching) Aldehida Keton Ester Asam karboksilat Amida Anhidrida	1600-1820 1690-1740 1650-1730 1735-1750 1735-1750 1710-1780 1760 dan 1810
Amida N-H	3100-3500
Nitril C= N	2240-2260
Alkohol, Eter, Ester, Asam Karboksilat, Anhidrida C-O Aldehida (C-H) Nitro (N=O)	1000-1300 2700-2800 dan 2800-2900 1300-1390 dan 1500-1600

[Sumber: Mudzakir 2008: 78--80.]

2.6.3 Komponen penyusun FTIR dan cara kerja alat.

FTIR terdiri dari beberapa bagian yaitu sumber inframerah, interferometer untuk mengubah cahaya inframerah yang polikromatik dan menghasilkan beberapa berkas cahaya membentuk sinyal interferogram, tempat sampel, detektor, yang disambung pada komputer untuk membaca data (Thermo Nicolet 2001: 5).

Cara kerja alat (Gambar 2.6.3) dimulai dari sumber inframerah mendistribusikan inframerah menuju sampel, inframerah kemudian memasuki interferometer dan penyandian spektrum berlangsung. Sinyal interferogram yang terbentuk keluar dari interferometer inframerah memasuki sampel dan frekuensi energi spesifik kemudian diserap oleh sampel, inframerah memasuki detektor untuk pengukuran akhir sinyal interferogram. Terakhir komputer mengolah sinyal yang telah diukur menjadi spektrum inframerah (Thermo Nicolet 2001: 5; Suseno & Firdausi 2008: 24--25).



Gambar 2.6.3. Skema proses analisis sampel pada FTIR
[Sumber: Suseno & Firdausi 2008: 25.]

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Kandang Rodensia, Laboratorium Biologi Perkembangan Departemen Biologi FMIPA UI, Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI, Depok. Penelitian dilakukan selama 6 bulan (Juli--Desember 2011).

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain FTIR IR Prestige-21 (Shimadzu), *assembly cell* (*cell frame*, *window ZnSe*, *rubber backing*, dan *screw*), timbangan digital, kandang metabolit, kaca objek, *cotton bud*, kapas, tisu, *eppendorf* (Bio Rad), *microtube* 1,5 ml (Axygen), lemari pendingin (Toshiba), mikroskop cahaya (Nikon SE), kamera digital (Sony), komputer jinjing (Zyrex), pensil, kertas label, bak plastik berukuran (30 x 20 x 10) cm³, dan kawat.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah sampel urine dari 10 ekor tikus albino (*Rattus norvegicus*) betina *strain* Sprague - Dawley berumur 3 bulan, dengan berat 150--200 gr. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain pewarna Giemsa, eter, alkohol 96% (Merck) dan asam pikrat.

3.3 Cara kerja

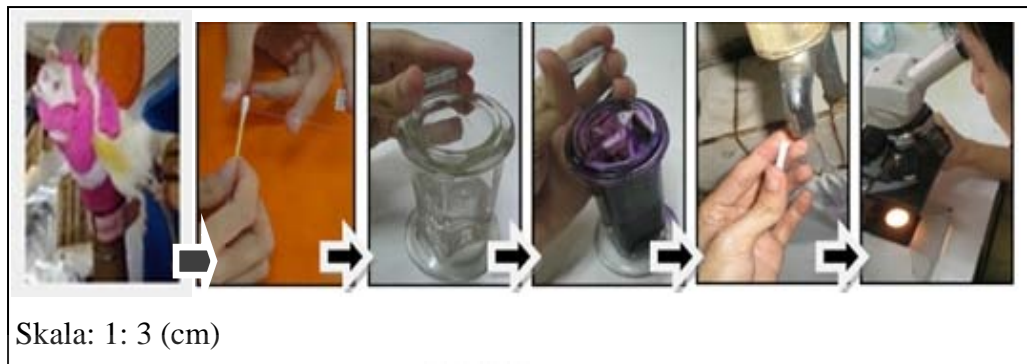
3.3.1 Pemeliharaan hewan uji

Dua hingga tiga ekor *R. norvegicus* ditempatkan dalam satu kandang berukuran (30 x 20 x 10) cm³ beralaskan serbuk kayu, dengan suhu 23° C, dan siklus 12 jam terang 12 jam gelap. Kandang dibersihkan setiap lima hari. Makanan dan minuman diberikan secara *ad libitum*. Seluruh *R. norvegicus* diberi tanda pengenal pada bagian kepala, telinga, ekstremitas depan, perut, punggung, ekstermitas belakang dan bokong menggunakan asam pikrat.

Sebelum dilakukan pengambilan sampel, *R. norvegicus* diaklimatisasi terlebih dahulu. Aklimatisasi berlangsung dua minggu, dengan parameter berat badan yang stabil pada 180--200 gr. Berat badan ditimbang setiap tiga hari, pada jam yang sama setiap harinya.

3.3.2 Penentuan fase siklus estrus

Fase siklus estrus setiap individu *R. norvegicus* ditentukan melalui pembuatan preparat ulas vagina. Epitel vagina diambil dengan memasukkan ujung *cotton bud* ke dalam vagina *R. norvegicus*. *Cotton bud* diputar dengan perlahan untuk memperoleh sel epitel pada dinding vagina. *Cotton bud* tersebut kemudian diulas dengan cara di putar pada kaca objek. Kaca objek diberi penanda berupa label dengan keterangan tanggal dan pengenal individu. Kaca objek kemudian direndam dalam alkohol absolut selama tiga menit, diikuti dengan pewarnaan menggunakan Giemsa selama 15 menit. Sisa pewarnaan kemudian dibersihkan di bawah air mengalir dan dikeringkan menggunakan tisu (Beimborn dkk. 2003). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 x 40. Hasil pengamatan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Prosedur tersebut di atas dilakukan setiap hari pada jam yang sama, selama satu bulan.

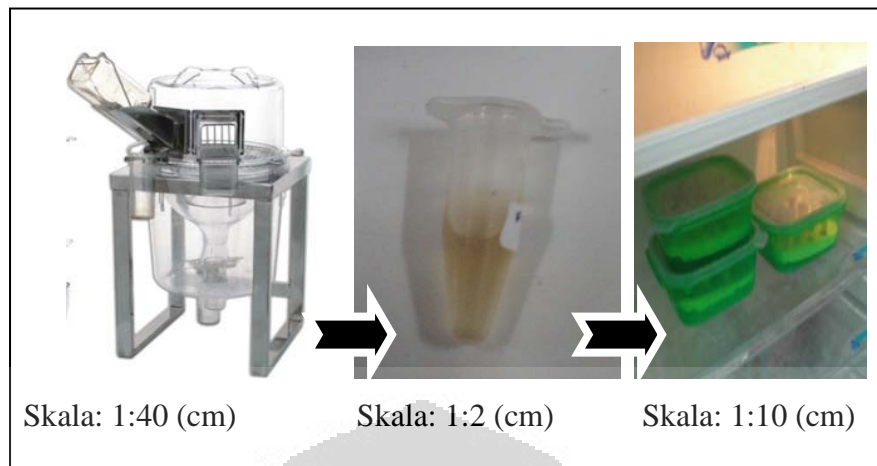


Gambar 3.3.2. Penentuan fase siklus estrus dengan preparat ulas vagina

3.3.3 Pengumpulan sampel urine

Setelah *R. norvegicus* diamati sepanjang siklus estrusnya, pengumpulan sampel urine kemudian dilakukan. Prosedur tersebut dilakukan selama 3 kali pada saat estrus dan 3 kali saat non-estrus. Sampel urine dikumpulkan untuk keperluan pengukuran FTIR sehingga diperoleh 60 buah sampel urine.

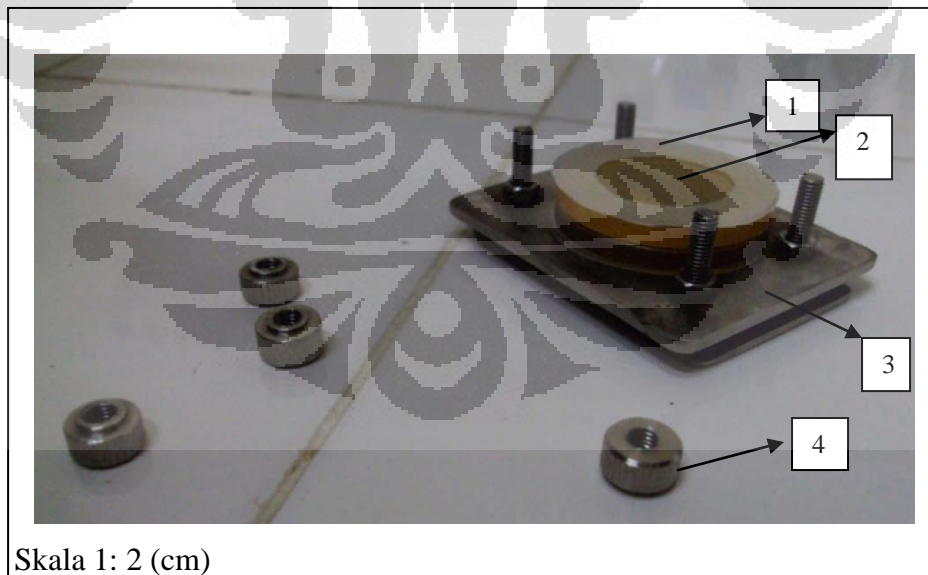
Prosedur pengumpulan sampel urine dilakukan dengan menggunakan 2 buah kandang metabolik. Setelah pemeriksaan masa estrus dengan preparat ulas vagina setiap hari diambil sampel yang terdiri dari saat estrus dan non estrus dalam kandang yang terpisah. Urine ditampung selama 24 jam, setelah 24 jam urine tikus yang tertampung di kandang metabolik disampling menggunakan pipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube* dengan volume 1,5 ml dan kemudian sebelum dilakukan analisis FTIR urine disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 8 °C.



Gambar 3.3.3. Pengambilan sampel urine

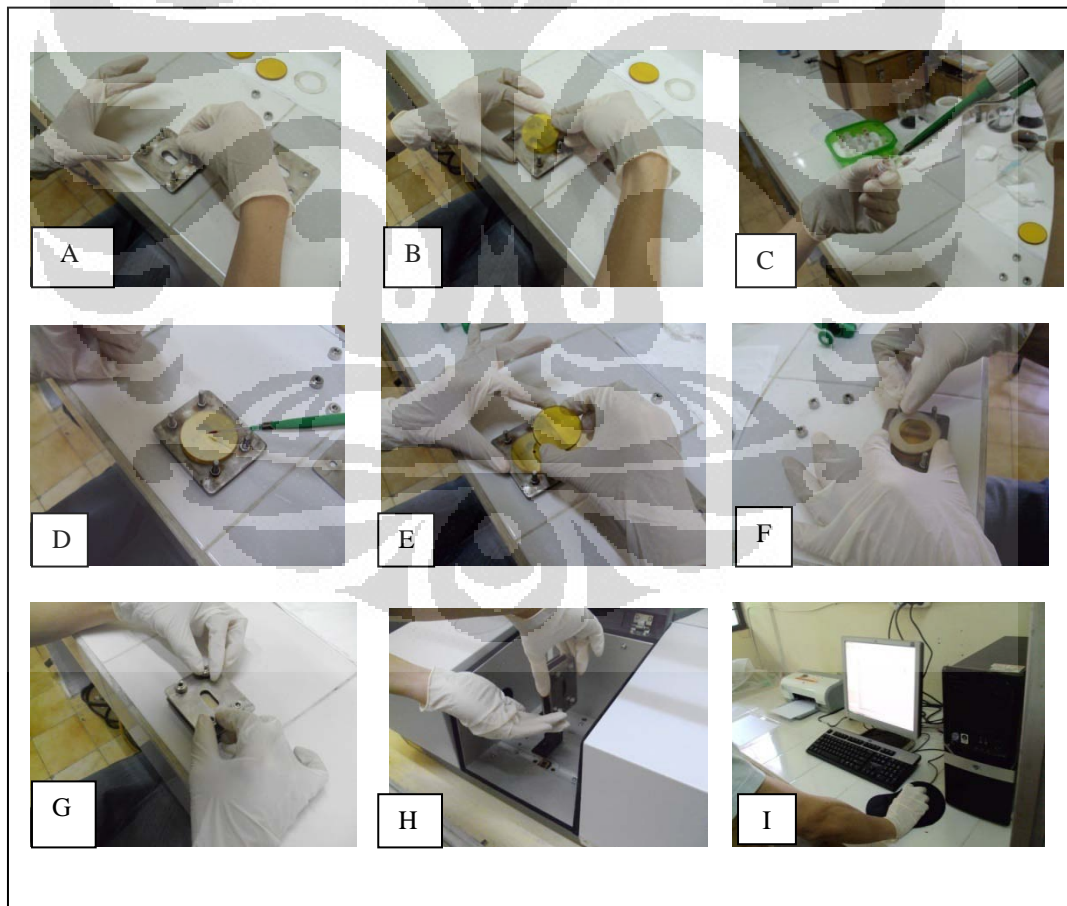
3.3.4 Analisis FTIR

Instrumen FTIR dinyalakan ketika tempat sampel dalam keadaan kosong. Komputer juga dinyalakan, kemudian program dijalankan. Pembuatan blanko dilakukan dengan memasukkan *assembly cell* tanpa sampel ke FTIR. Analisis sampel kemudian dilakukan setelah spektrum blanko tertampil.



Gambar 3.3.4.(1) *Assembly cell* yang terdiri atas *rubber backing* (1), *Window Znse* (2), *cell frame* (3), dan *screw* (4)

Assembly cell (Gambar 3.3.4.(1)) terdiri atas beberapa bagian, yaitu *cell frame*, *window ZnSe*, *rubber backing*, dan *screw*. Prosedur perakitan *assembly cell* ialah sebagai berikut: *Rubber backing* diletakkan di atas *cell frame* (Gambar 3.3.4.(2) A), kemudian *window ZnSe* diletakkan di atas *rubber backing* tersebut (Gambar 3.3.4.(2) B). Sampel urine diambil 0,5 μl menggunakan *eppendorf* (Gambar 3.3.4.(2) C), kemudian urine diteteskan pada bagian tengah *window ZnSe* (Gambar 3.3.4.(2) D). *Window ZnSe* kemudian ditumpuk dengan *window ZnSe* lainnya (Gambar 3.3.4.(2) E). *Rubber backing* diletakkan di atas tumpukan *window ZnSe* (Gambar 3.3.4.(2) F), lalu ditutup dengan *cell frame* dan *screw* (Gambar 3.3.4.(2) G). *Assembly cell* lalu dimasukkan ke tempat sampel pada FTIR (Gambar 3.3.4.(2) H) dan selanjutnya di-*scan* pada bilangan gelombang 400 cm^{-1} hingga 4000 cm^{-1} (Gambar 3.3.4.(2) I). Cetakkan hasil *scan* berupa spektrum inframerah kemudian digunakan untuk interpretasi data.



Gambar 3.3.4.(2). Prosedur perakitan *assembly cell*

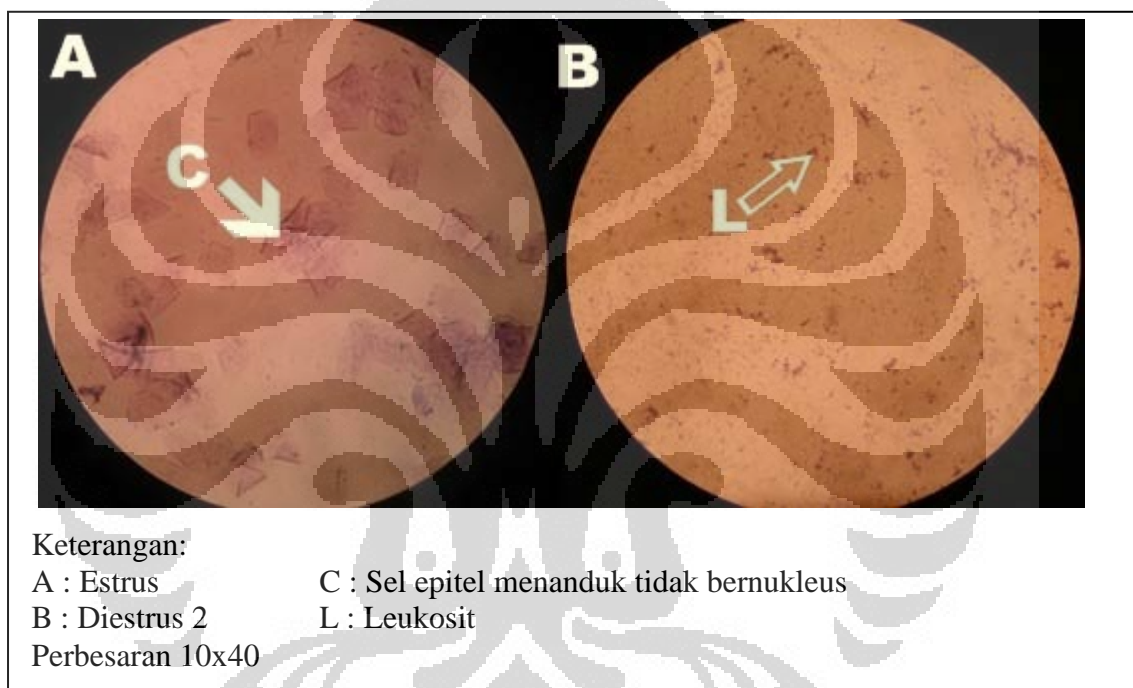
3.4 Analisis data

Sebanyak 60 buah spektrum FTIR sampel urine yang berasal dari 10 ekor tikus *R. norvegicus* pada dua kondisi yaitu saat estrus dan non-estrus selama 3 siklus estrus, dikonversi ke bentuk numerik melalui *Microsoft Notepad 5.1* dan diolah menggunakan *Microsoft Office Excel 2007*. Data numerik terdiri dari bilangan gelombang (cm^{-1}) dari gugus fungsi senyawa dalam sampel urine beserta absorbansinya (%). Dari ribuan data numerik yang tersedia, bilangan gelombang dari gugus fungsi spesifik kortikosteron 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 kortikosteron selama siklus estrus. Dilakukan uji statistik menggunakan *software SPSS 16* dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov (KS) sebagai uji normalitas, dan uji t berpasangan untuk uji makna.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penentuan fase siklus estrus dengan metode ulas vagina

Metode yang digunakan untuk menentukan fase siklus estrus adalah metode ulas vagina. Pengamatan mikroskopis morfologi populasi dapat dilihat di gambar 4.1. Fase yang diamati adalah fase estrus dan fase diestrus 2.



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

Gambar 4.1 menunjukkan pada preparat fase estrus terdapat populasi sel epitel menanduk tidak bernukleus dan pada preparat fase diestrus terdapat populasi sel leukosit. Hasil pengamatan sesuai dengan literatur (Beimborn dkk. 2003: 3) pada saat fase estrus terdapat sel epitel menanduk tidak bernukleus sedangkan pada fase diestrus 2 lebih didominasi oleh sel leukosit.

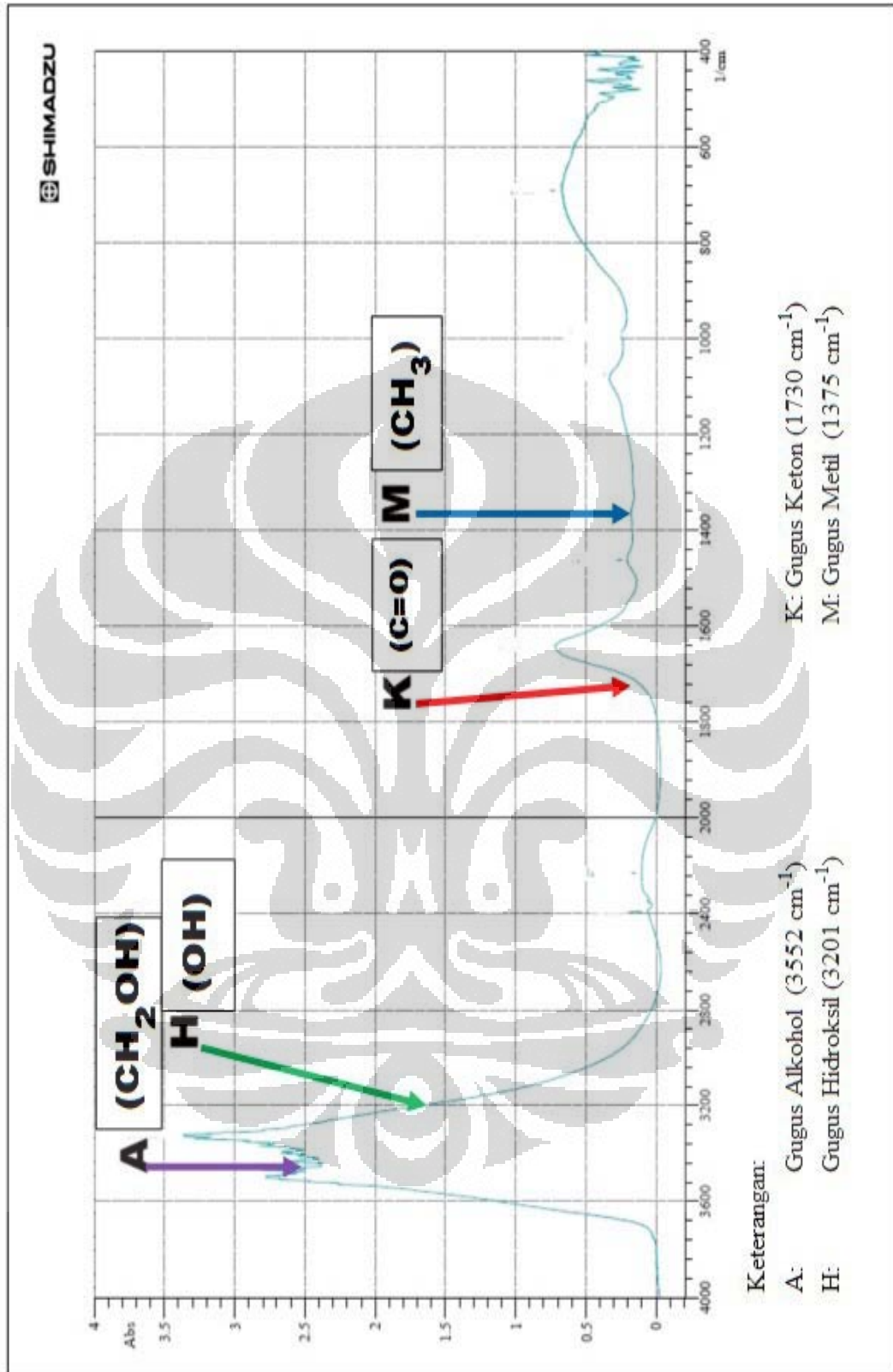
4.2. Pengumpulan sampel urine

Pengumpulan sampel urine dilakukan saat *R. norvegicus* berada pada kondisi estrus dan non estrus. Kondisi sampel yang diperoleh adalah sampel urine berwarna kuning, berbau, cair tidak kental dan volume urine yang dieksresikan selama 24 jam berkisar antara 3 ml--5 ml, hal tersebut menunjukkan tikus dalam keadaan sehat. Menurut Albala dkk. (2011) urine dapat menggambarkan keadaan tubuh apakah dalam keadaan sehat atau tidak. Tubuh dan sistem ekskresi dikatakan sehat jika urine yang diekskresikan bening kekuningan dan tidak kental.

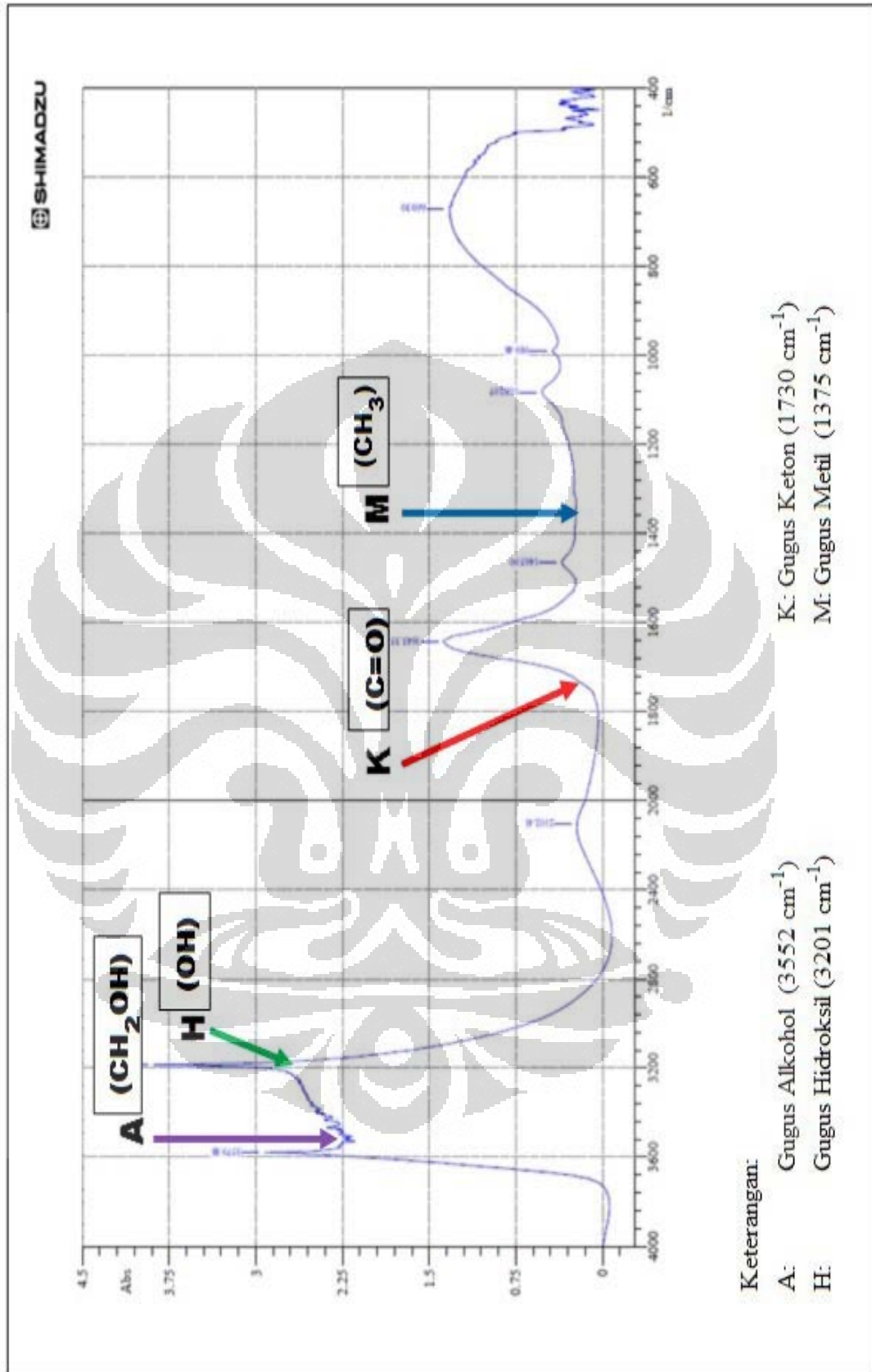
Sampel yang diperoleh sebanyak 60 sampel urine dari 10 tikus pada 3 periode siklus estrus dimana di masing-masing periode disampling pada kondisi estrus dan non estrus.

4.3 Analisis spektrum FTIR

Gambaran hasil analisis FTIR adalah sebuah spektrum dengan kisaran bilangan gelombang 400--4000 cm^{-1} , yang terdiri atas bilangan gelombang (cm^{-1}) pada sumbu X, nilai absorbansi (%) pada sumbu Y. Spektrum tersebut memiliki banyak *peak* yang merepresentasikan gugus fungsi dari berbagai senyawa dalam urine. Gambar 4.3 (1) merupakan contoh spektrum FTIR analisis sampel urine seekor tikus yang diambil saat estrus dan gambar spektrum FTIR sampel urine pada fase non-estrus (Gambar 4.3 (2)).



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

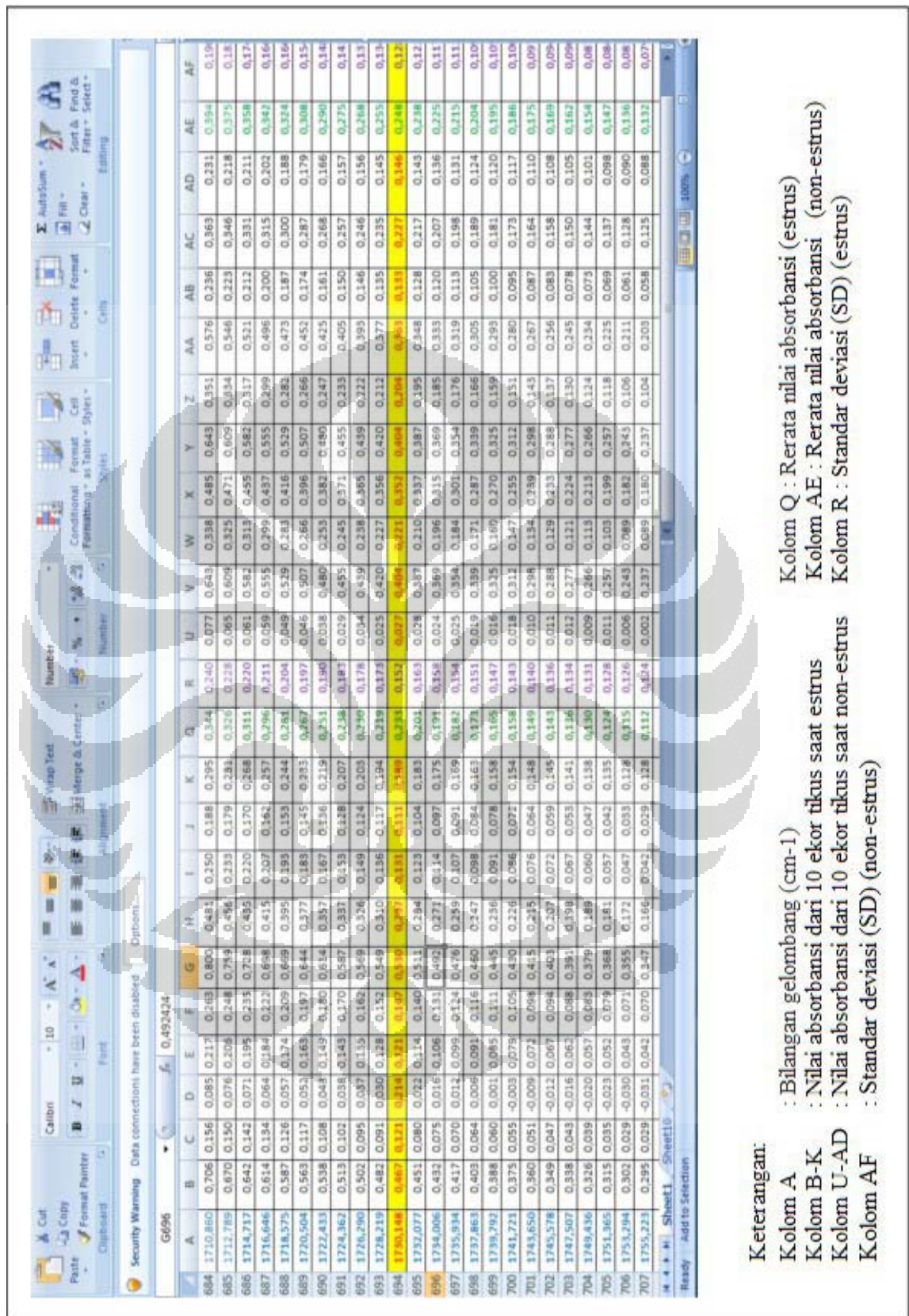


Gambar 4.3 (2). Spektrum FTIR dari urine *R. norvegicus* saat non-estrus

Hormon kortikosteron dapat dikenali dan diidentifikasi melalui gugus alkohol (CH_2OH), hidroksil (OH) dan metil (CH_3) (Gambar 2.3.4) (HMDB 2009: 1). Ketiga gugus fungsi tersebut menjadi acuan dalam penentuan jumlah kadar kortikosteron dalam urine. Ketiga gugus fungsi tersebut memiliki bilangan gelombang yang berbeda-beda. Sebagai senyawa pembanding dan faktor koreksi antar sampel digunakan senyawa kreatinin yang kadarnya selalu tetap di dalam urine dan kreatinin digunakan sebagai faktor koreksi dalam penelitian ini. Gugus fungsi dari kreatinin yang akan diidentifikasi adalah gugus keton yang telah diperoleh Sjahfirdi dkk. (2011 (b)) yang menggunakan gugus keton sebagai gugus spesifik dari kreatinin pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} .

4.3.1 Penentuan gugus spesifik dari kreatinin

Kreatinin dalam penelitian ini digunakan sebagai senyawa pembanding dan faktor koreksi antar sampel, karena kadar kreatinin dianggap relatif sama pada semua sampel urine. Penelitian yang dilakukan oleh Sjahfirdi dkk. (2011(b)) gugus fungsi spesifik dari kreatinin yang digunakan adalah gugus keton yang berada pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} , sesuai dengan Smith (1979: 281--282), gugus keton terbaca dalam spektrum FTIR pada bilangan gelombang $1650\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ (Smith1979: 281--282).



Kolom Q : Rerata nilai absorbanasi (estrus)
Kolom AE : Rerata nilai absorbanasi (non-estrus)
Kolom R : Standar deviasi (SD) (estrus)

Keterangan:
Kolom A : Bilangan gelombang (cm-1)
Kolom B-K : Nilai absorbanasi dari 10 ekor tikus saat estrus
Kolom U-AD : Nilai absorbanasi dari 10 ekor tikus saat non-estrus
Kolom AF : Standar deviasi (SD) (non-estrus)

Gambar 4.3.1. Data numerik nilai absorbanasi gugus keton di bilangan gelombang 1730 cm⁻¹ menggunakan *microsoft excel*

Gambar 4.3.1 adalah tampilan dari *microsoft excel* yang berisi sebagian data numerik nilai absorbansi urine. Pada *microsoft excel* terdapat urutan bilangan gelombang dari 400--4000 cm^{-1} di bagian paling kiri (kolom A) dan nilai absorbansi sampel urine *R. norvegicus* saat estrus dan non estrus di kolom selanjutnya (kolom B--AD).

Baris berwarna kuning menandakan bilangan gelombang gugus keton yang dipilih dari 1650--1730 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1730 cm^{-1} dipilih sebagai penanda kreatinin karena memiliki standar deviasi (SD) terkecil di antara bilangan gelombang gugus keton di 1690--1730 cm^{-1} (Sjahfirdi dkk. 2011(b): 159--160).

Tabel 4.3.1. Nilai absorbansi kreatinin (1730 cm^{-1}) yang merepresentasikan kreatinin dari 10 ekor tikus

Kreatinin (1730 cm^{-1})			
Estrus		Non Estrus	
Tikus	Absorbansi (%)	Tikus	Absorbansi (%)
1	0,47	1	0,40
2	0,12	2	0,03
3	0,21	3	0,22
4	0,12	4	0,35
5	0,15	5	0,40
6	0,53	6	0,20
7	0,30	7	0,36
8	0,13	8	0,13
9	0,11	9	0,23
10	0,19	10	0,15
Rerata	0,23	Rerata	0,25
SD	0,15	SD	0,13

Berdasarkan Tabel 4.3.1, rerata nilai absorbansi dari gugus keton pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} memiliki nilai rerata yang tidak berbeda signifikan saat estrus dan non-estrus. Setelah dilakukan uji statistik data kreatinin pada kondisi estrus dan non estrus tidak memiliki perbedaan bermakna (lampiran 3). Rerata dari nilai absorbansi 0,23% dan 0,25% dari Tabel 4.3.1 direrata kembali, sehingga diperoleh satu nilai absorbansi untuk kreatinin 0,24 %. Nilai rerata tersebut digunakan sebagai faktor koreksi dalam penelitian ini.

4.3.2 Penentuan bilangan gelombang gugus fungsi kortikosteron

Gugus fungsi spesifik kortikosteron yang terbaca pada spektrum adalah alkohol (CH_2OH), metil (CH_3), dan hidroksil (OH). Alkohol terdapat pada kisaran bilangan gelombang $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, metil pada $1375\text{--}1382\text{ cm}^{-1}$, dan hidroksil pada $2400\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ (Smith 1979: 281--282). Bilangan gelombang 3552 cm^{-1} untuk alkohol, 1375 cm^{-1} untuk metil, dan 3201 cm^{-1} untuk hidroksil dipilih sebagai penanda kortikosteron karena memiliki SD yang relatif kecil dibandingkan SD bilangan gelombang lainnya.

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

Tikus	Absorbansi (%)					
	3201 cm^{-1} (Hidroksil)		3552 cm^{-1} (Alkohol)		1375 cm^{-1} (Metil)	
	Estrus	Non estrus	Estrus	Non estrus	Estrus	Non estrus
1	1,58	1,26	1,50	1,23	0,52	0,56
2	1,70	2,79	1,72	2,33	0,67	0,72
3	1,43	2,91	1,59	2,28	0,50	0,54
4	1,15	1,62	1,18	1,50	0,25	0,25
5	2,37	2,79	2,25	2,33	0,34	0,32
6	3,51	2,51	2,71	2,59	0,33	0,39
7	2,53	1,47	2,18	1,40	0,51	0,59
8	2,16	2,24	2,08	2,51	0,29	0,26
9	1,84	3,00	2,08	2,52	0,53	0,48
10	3,41	1,16	2,54	1,04	0,53	0,57
Rerata	2,17	2,17	1,98	1,97	0,45	0,47
SD	0,80	0,73	0,48	0,60	0,14	0,16

Tabel 4.3.2(1) menunjukkan nilai absorbansi gugus spesifik dari kortikosteron pada 10 ekor tikus pada masa estrus dan non estrus, nilai pada tabel di atas menunjukkan nilai rerata yang tidak berbeda signifikan yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nilai kortikosteron pada saat estrus dan non estrus. Meski demikian nilai pada tabel di atas belum direlatifkan dengan faktor koreksi kreatinin sebagai senyawa pembanding dalam urine, sehingga nilai di atas belum

dapat menggambarkan keadaan kortikosteron yang sebenarnya, karena keadaan sampel masih dianggap memiliki variasi interindividu.

Tabel 4.3.2(2). Nilai absorbansi gugus fungsi spesifik kortikosteron dari 10 ekor tikus yang telah direlatifkan terhadap kreatinin (/ % Cr)

Tikus	Absorbansi (%) / % Cr					
	3201 cm ⁻¹ (Hidroksil)		3552 cm ⁻¹ (Alkohol)		1375 cm ⁻¹ (Metil)	
	Estrus	Non estrus	Estrus	Non estrus	Estrus	Non estrus
1	6,76	5,09	6,44	4,95	2,22	1,96
2	7,30	11,23	7,40	9,38	2,89	2,90
3	6,15	11,74	6,84	9,19	2,16	2,16
4	4,92	6,51	5,07	6,05	1,94	1,82
5	10,14	11,23	9,66	9,38	1,45	1,29
6	15,05	10,12	11,65	10,43	1,40	1,58
7	10,84	5,92	9,34	5,65	2,17	2,37
8	9,27	9,03	8,94	10,11	1,25	1,05
9	7,87	12,08	8,93	10,14	2,27	1,94
10	14,61	4,68	10,88	4,18	2,25	2,31
Rerata	9,29	8,76	8,51	7,94	2,00	1,94
SD	3,43	2,93	2,06	2,44	0,50	0,54

Melalui tabel 4.3.2(2) diperoleh nilai absorbansi kadar kortikosteron dalam persen (%) absorbansi per % kreatinin (/ % Cr). Berdasarkan Tabel 4.3.2(2), tiga gugus fungsi memiliki rerata nilai absorbansi lebih kecil pada kondisi non estrus dibandingkan estrus, tetapi memiliki selisih rerata nilai absorbansi yang tidak terlalu signifikan antara kondisi estrus dan non-estrus.

Ketiga gugus fungsi memiliki nilai rerata yang relatif sama, sesuai penelitian yang dilakukan Guo dkk. 1994 menyatakan bahwa kortikosteron tidak dipengaruhi oleh siklus estrus, yaitu pada saat estrus dan non estrus kadar kortikosteron cenderung sama pada tikus yang tidak diberi perlakuan (Guo dkk. 1994: 536--537).

Berdasarkan uji statistik menggunakan SPSS 16, uji yang dilakukan adalah uji perbandingan 2 sampel yaitu saat estrus dan non estrus. Uji yang digunakan adalah uji t berpasangan dengan N=10. Sebelum dilakukan uji makna,

terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Kolmogorov Smirnov (KS). Hasil uji normalitas mendapatkan bahwa semua data yaitu data alkohol, hidroksil dan metil berdistribusi normal. Ketiga kelompok data tersebut memiliki nilai D absolut < (lebih kecil) dari nilai tabel (nilai tabel untuk N=10 dengan derajat kepercayaan 0,05 adalah 0,409). (lampiran 1) Setelah diketahui semua kelompok data berdistribusi normal selanjutnya dilakukan uji t berpasangan. Hasil dari uji makna dengan uji t berpasangan mendapatkan bahwa ketiga gugus fungsi tidak memiliki perbedaan bermakna antara estrus dan non estrus. Uji statistik dengan SPSS 16 menunjukkan hasil semua gugus fungsi memiliki nilai t hitung < t tabel (nilai t tabel untuk N=10 dengan derajat kepercayaan 0,05 adalah 1,833) (Greasley: 2008: 88). (lampiran 2 dan 3)

Ketiga gugus fungsi spesifik memiliki nilai yang tidak berbeda bermakna pada kondisi estrus dan non estrus, jika ketiga gugus fungsi tersebut dibandingkan, maka gugus metil (1375 cm^{-1}) memiliki fluktuasi yang lebih merata antara kondisi estrus dan non estrusnya. Dibandingkan dengan gugus alkohol dan hidroksil yang memiliki fluktuasi beragam.

Tabel 4.3.2(3). Rerata perbandingan absorbansi ketiga gugus fungsi spesifik kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus dari 10 ekor tikus

Perbandingan rerata absorbansi estrus dan non estrus		
Gugus Fungsi	Absorbansi (%) / % Cr	
	Rerata Estrus	Rerata Non Estrus
Alkohol (3552 cm^{-1})	$8,51 \pm 2,06$	$7,94 \pm 2,44$
Hidroksil (3201 cm^{-1})	$9,29 \pm 3,43$	$8,76 \pm 2,93$
Metil (1375 cm^{-1})	$2,00 \pm 0,50$	$1,94 \pm 0,54$

Tabel 4.3.2(3) menunjukkan nilai rerata perbandingan antara fase estrus dan non estrus dengan gugus metil memiliki nilai SD yang paling kecil. Rerata perbandingan nilai absorbansi di masing-masing gugus spesifik pada kondisi

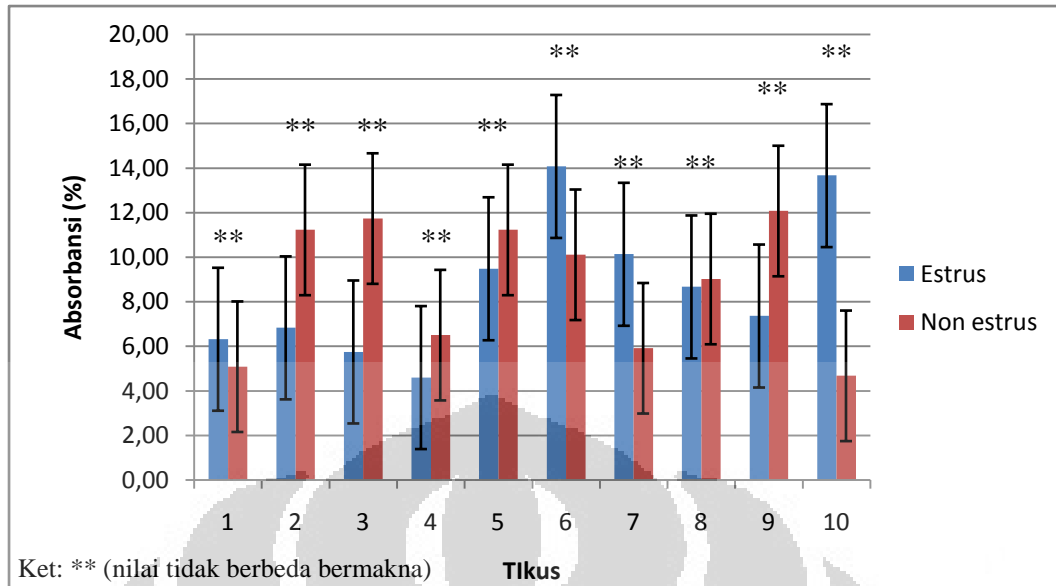
estrus dan non estrus dapat dilihat pada Gambar 4.3.2(1), Gambar 4.3.2(2), dan Gambar 4.3.2(3).

**
** ** ** **
** **
** **
** **

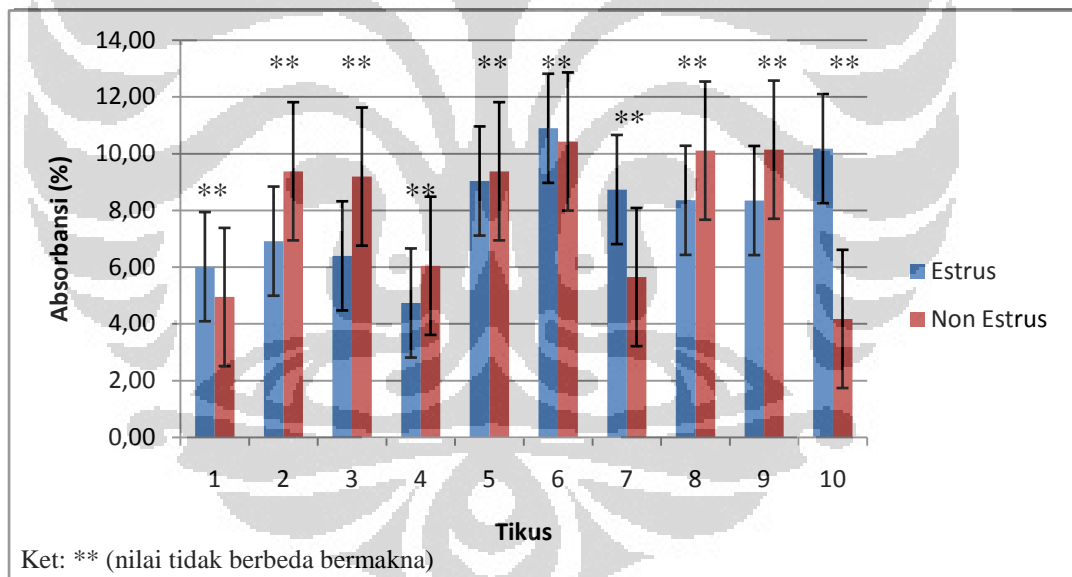
Ket: ** (nilai tidak berbeda bermakna)

Gambar 4.3.2(1). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif terhadap kreatinin gugus fungsi metil (CH_3) (1375 cm^{-1}) saat estrus dan non estrus

Gambar 4.3.2(1) menunjukkan grafik perbandingan nilai absorbansi gugus metil (CH_3) (1375 cm^{-1}) saat estrus dan non estrus di masing-masing tikus, terlihat bahwa dari 10 tikus tidak terdapat perbedaan nilai absorbansi yang signifikan antara kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus, pada tikus 3 dan 4 terlihat memiliki nilai yang hampir sama. Hasil tersebut sesuai dengan Guo dkk. (1994) yang menyatakan bahwa kortikosteron memiliki nilai yang tidak berbeda bermakna antara kondisi estrus dan non estrus dan kortikosteron tidak dipengaruhi oleh siklus estrus.



Gambar 4.3.2(2). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif terhadap kreatinin gugus fungsi hidroksil (OH) (3201 cm^{-1}) saat estrus dan non estrus



Gambar 4.3.2(3). Grafik perbandingan nilai absorbansi relatif terhadap kreatinin gugus fungsi alkohol (CH_2OH) (3552 cm^{-1}) saat estrus dan non estrus

Gambar 4.3.2(2) dan 4.3.2(3) menunjukkan fluktuasi yang beragam dengan 50 % populasi tikus menunjukkan fluktuasi yang signifikan, dan terlihat perbedaan nilai yang tinggi antara kondisi estrus dan non estrus. Uji statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna saat estrus dan non estrus. Tetapi terdapat perbedaan nilai yang tinggi seperti yang terlihat pada tikus 10. Gugus hidroksil

dan alkohol memiliki nilai absorbansi saat estrus jauh lebih tinggi dibandingkan nilai absorbansi saat non estrus. Hal tersebut dapat disebabkan pengaruh senyawa lain dalam urine yang juga memiliki gugus yang sama, misalnya air yang juga memiliki ikatan hidroksil. Air juga merupakan unsur terbesar yang menyusun urine. Dengan demikian, gugus alkohol dan hidroksil dianggap tidak cukup kuat untuk menggambarkan kortikosteron dalam urine.

Hasil menunjukkan bahwa gugus yang dapat menggambarkan kortikosteron dalam urine adalah gugus metil (CH_3) pada bilangan gelombang 1375 cm^{-1} . Nilai rerata absorbansi kortikosteron saat estrus adalah $2,00 \% \pm 0,50 \% / \% \text{ Cr}$ dan saat non estrus adalah $1,94 \% \pm 0,54 \% / \% \text{ Cr}$. Antara kondisi estrus dan non estrus tidak ada perbedaan bermakna, setelah dilakukan uji statistik dengan uji t berpasangan. Terlihat data kortikosteron memiliki nilai yang tidak berbeda makna pada kondisi estrus dan non estrus sesuai dengan pernyataan (Guo dkk. 1994: 536--537), hasil uji statistik dengan SPSS 16 menunjukkan baik data kortikosteron pada kondisi estrus dan non estrus memiliki nilai t hitung < t tabel yang berarti siklus estrus tidak mempengaruhi kadar kortikosteron.

Penelitian ini mendapatkan hasil kadar kortikosteron yang memiliki nilai yang tidak berbeda bermakna pada kondisi estrus dan non estrus. Rerata absorbansi kortikosteron dalam % Cr yang diukur dengan FTIR saat estrus adalah $2,00 \% \pm 0,50 \% / \% \text{ Cr}$ dan saat non estrus adalah $1,94 \% \pm 0,54 \% / \% \text{ Cr}$.

Hasil nilai absorbansi FTIR jika divalidasikan dengan data sekunder dari literatur dan penelitian sebelumnya (Guo dkk. 1994; Siswanto 2007; Hancock 2010) yaitu kadar kortikosteron tikus normal yang tidak mengalami stres dalam urine dan feses adalah sebesar 15 ng/ml (Guo dkk. 1994; Ganong 2001: 520; Siswanto 2007:8; Hancock 2010: 26), maka 1% absorbansi kortikosteron dalam % Cr ekuivalen dengan $7,50 \text{ ng/ml}$ untuk estrus dan $7,73 \text{ ng/ml}$ untuk non estrus. Hasil angka tersebut didapat dengan cara membagi nilai pengukuran RIA 15 ng/ml dengan rerata nilai pengukuran dengan FTIR yaitu $2,00 \% \pm 0,50 \% / \% \text{ Cr}$ untuk nilai estrus dan $1,94 \% \pm 0,54 \% / \% \text{ Cr}$ untuk nilai non estrus. Perbandingan FTIR dengan metode lain (RIA) adalah 1 % absorbansi FTIR sebanding dengan $7,50 \text{ ng/ml}$ untuk estrus dan $7,73 \text{ ng/ml}$ untuk non estrus.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Kortikosteron diwakili oleh 3 gugus fungsi yaitu alkohol (CH_2OH) pada bilangan gelombang 3552 cm^{-1} , gugus hidroksil (OH) pada bilangan gelombang 3201 cm^{-1} dan metil (CH_3) pada bilangan gelombang 1375 cm^{-1} .
2. Gugus yang menggambarkan kortikosteron adalah gugus metil (CH_3) pada bilangan gelombang 1375 cm^{-1} dengan nilai absorbansi pada kondisi estrus $2,00\% \pm 0,50\% / \% \text{ Cr}$ dan non estrus adalah $1,94\% \pm 0,54\% / \% \text{ Cr}$.
3. Nilai absorbansi kortikosteron memiliki nilai yang tidak berbeda bermakna pada kondisi estrus dan non estrus.
4. Perbandingan dengan RIA adalah 1 % absorbansi FTIR sebanding dengan 7,50 ng/ml untuk estrus dan 7,73 ng/ml untuk non estrus pada RIA.

5.2. Saran

Penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sampel urine dari spesies lain dibutuhkan untuk menekankan kemampuan FTIR dalam menganalisis kortikosteron. Diharapkan hasil yang didapat akan diketahui apakah hasil FTIR bersifat universal atau bersifat spesies spesifik.

DAFTAR REFERENSI

- Albala, D.L., A.F. Morrey, L.G. Gomella, & J.P. Stein. 2011. *Urology*. Oxford University Press, Inc, New York: xviii + 691 hlm.
- 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.
- Anwar, R. 2005. Sintesis, fungsi dan interpretasi pemeriksaan hormon reproduksi. Skripsi S1 Program Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran 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>, 4 Maret 2011, Pk. 13.10 WIB.
- Brann, D.W. & V.B. Mahesh. 1991. Role of corticosteroid in female reproduction. *The Faseb Journal*. **5**: 2691--2698.
- 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.
- 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.
- Devi, T. S. R, S. Gunasekaran, J.W. Hudson, S. Angelah, & I. Joybell. 2009. Analysis on renal failure patients blood samples: characterization and efficacy study. *Indian Journal of Science and Technology*. **2**(2): 46--50.
- Dobson, S. & R.F. Smith. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction?. *Animal Reproduction Sciences*. **60**(61): 743--752.

- Fischbach, M. & M.B. Dunning. 2009. *A manual of laboratory and diagnostic test*. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, New York: xii + 1280 hlm.
- Fitrianti. 2002. Efektivitas penyuntikan prostaglandin satu kali dan dua kali untuk sinkronisasi estrus tikus putih (*Rattus sp.*). Skripsi S1 Program Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor: x + 38 hlm.
- Ganong, W.F. 2001. *Review of medical physiology*. 20th ed. McGraw Hill Company In, New York: xxxiii + 1007 hlm.
- Greasley, P. 2008. *Quantitative data analysis using SPSS: An introduction for health & social science*. McGraw Hill Open University Press, New York: vi + 138 hlm.
- Guo, Ai Li, P. Felice, M. Cricoulo, G. Ficarra, R.E. Nappi, M. Palombo, A. Valentini & A.R. Genazzani. 1994. Acute stress or lipopolysaccharide induced corticosterone secretion in female rats independent of the oestrus cycle. *European Journal of Endocrinology*. 121(9): 535--539.
- Guyton, A.C. & J.E. Hall. 2006. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania: xxxv + 1116 hlm.
- Hancock, T.M. 2010. A duality mammalian glucocorticoid signaling. Thesis degree of Master of Science Departement of Biology, Queen's University, Ontario, Canada: x + 86 hlm.
- 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.
- Houwen, B. 2000. Blood film preparation and staining procedures. *Laboratory hematologi*. 6: 1--7.
- Human Metabolome Database (HMDB). 2009. Corticosteron, 2009: 1 hlm. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01547>. 11 Desember 2011, Pk 12.08 WIB. (a)
- Human Metabolome Database (HMDB). 2009. Creatinine, 2009: 1 hlm. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00562>. 11 Desember 2011, Pk 12.20 WIB. (b)
- Imelda, E. R., & E.P. Andani. 2006. Perbandingan efek diuretika serta kadar natrium dan kalium darah antara pemberian ekstrak daun tempuyung

- (*Sonchus arvensis* Linn) dengan furosemida. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. **11**(2): 77--80.
- Jonhson, E. K. 1991. *Histology and cell biology*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore: xiii + 409 hlm.
- 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
- Kustritz, M.V.R. 2010. *Clinical canine and feline reproduction*. Blackwell publishing, Iowa: xv + 315 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.
- Lohmiller, J.J. & S.P. Swing. 2006. Reproduction and breeding. *Dalam:* Suckow, Mark A., S.H. Weisbroth, & C.L. Franklin. 2006. *The laboratory rat*. 2nd edition. Elsevier Academic Press, Burlington: xvi + 915 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.
- Maryam, R. 2007. Metode deteksi mikotoksin. *Jurnal Mikrobiologi Kedokteran Indonesia*. **7**(1--2): 12--24.
- Monfort, S.L., D.L. Dess, S.E. Shideler, S.J. Samuels, A.G. Hendrickx, & B.L. Lesley. 1987. Comparison of serum estradiol to urineary estron conjugates in rhesus macacaque (*Macaca mulatta*). *Biology of Reproduction*. **37**: 832-837.
- 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.
- Norris, D.O. 2007. *Vertebrate endocrinology*. 4th ed. Elsevier Academic Press, Burlington: ix + 562 hlm.

- O'Connor, K.A., E. Brindle, D.J. Holman, N.A. Klein, M.R. Soules, K.L. Campbell, Fortu'ne 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.
- Ohnishi, M., H. Yajima, T, Takemura, S. Yamamoto, T. Matsushima, & T. Ishii. 2000. Characterization of hydroxy-biphenyl-o-sulfates in urine and urine crystals induced by biphenyl and KHCO₃ administration in rats. *Journal of Health Science*. **46**(4): 299--303.
- Petibois, C., G. Cazorla, A. Cassaigne, & G. De l'e'ris. 2001. Plasma protein contents determined by fourier-transform infrared spectrometry. *Clinical Chemistry*. **47**(4): 730--738.
- Ross, M.H., G.I. Kaye, & W. Pawlina. 2002. *Histology: a text and atlas*. 4th edition. Williams & Wilkins, Baltimore: x + 875 hlm.
- Seaward, B.L. 1999. *Managing stress: principles and strategies for health and wellbeing*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publisher, Toronto, Canada: xxviii + 482 hlm.
- Shugaba, A.I., J.O. Hombolu, S.A. Ojo, & S.A. Asala. 2010. The effects of induced physical and oxidative stress on the cortisol levels of female wistar rat. *Journal of Medicine in the Tropics*. **12**: 72--75.
- Shuzhou fengshi laboratory. 2008. New type of rat metabolic cage. 2008: 1 hlm. <http://www.shu-sz.com/en/ShowProduct.asp?id=130>. 4 Maret 2011, Pk 20.14 WIB.
- Siswanto, H. 2007. Telaah induksi ACTH terhadap konsentrasi kortikosteron dalam darah dan feses tikus jantan Spargue Dawley. Skripsi S1 Program Biokimia. Institut Pertanian Bogor, Bogor: x + 25 hlm.
- Sjahfirdi, L., A. Septian, H. Maheswari, P. Astuti, F.D. Suyatna & M. Nasikin. 2011. Determination of estrous period in female rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy through identification of reproductive hormone in blood samples. *World Applied Sciences Journal*. **14**(4): 539--545. (a)

- Sjahfirdi, L., S.N. Azzis, H. Maheswari, P. Astuti, F.D. Suyatna & M. Nasikin. 2011. Determination of estrous period in female rats (*Rattus norvegicus*) by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy through identification of metabolite reproductive hormone in urine samples. *International Journal of Basics and Applied Sciences* . **11**(3): 158--163. (b)
- 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.
- Sumaryono, W., A.E. Wibowo, S. Ningsih, K. Agustini, R. Sumarny, F. Amri & - H. Winarno. 2008. Analisis kreatinin – urea tikus putih pasca pemberian ekstrak mahkota dewa dan herba pegagan. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **6**(1): 35--40.
- Suseno, E.J. & K.S. Firdausi. 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.
- Thompson, A.L., P.L. Whitten, M.L. Johnson & M. Lampl. 2010. Non-invasive methods for estradiol recovery from infant fecal samples. *Frontier in Physiology*. **148**(1): 1--8.
- Wudy, S.A, M.F. Hartmann, & T. Remer. 2007. Sexual dimorphism in cortisol secretion starts after age 10 in healthy children: urinary cortisol metabolite excretion rates during growth. *American Journal Physiol Endocrinol Metababolic*. **293**: 970--976.

Lampiran 1

Tabel nilai kritis (d) uji normalitas Kolmogorov Smirnov

n / α	$\alpha = 0,20$	$\alpha = 0,10$	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,02$	$\alpha = 0,01$
1	0,900	0,950	0,975	0,990	0,995
2	0,684	0,776	0,842	0,900	0,929
3	0,565	0,636	0,708	0,785	0,829
4	0,493	0,565	0,624	0,689	0,734
5	0,447	0,509	0,563	0,627	0,669
6	0,410	0,468	0,519	0,577	0,617
7	0,381	0,436	0,483	0,538	0,576
8	0,359	0,410	0,454	0,507	0,542
9	0,339	0,387	0,430	0,480	0,513
10	0,323	0,369	0,409	0,457	0,486
11	0,308	0,352	0,391	0,437	0,468
12	0,296	0,338	0,375	0,419	0,449
13	0,285	0,325	0,361	0,404	0,432
14	0,275	0,314	0,349	0,390	0,418
15	0,266	0,304	0,338	0,377	0,404
16	0,258	0,295	0,327	0,366	0,392
17	0,250	0,286	0,318	0,355	0,381
18	0,244	0,279	0,309	0,346	0,371
19	0,237	0,271	0,301	0,337	0,361
20	0,232	0,265	0,294	0,329	0,352
21	0,226	0,259	0,287	0,321	0,344
22	0,221	0,253	0,281	0,314	0,337
23	0,216	0,247	0,275	0,307	0,330
24	0,212	0,242	0,269	0,301	0,323
25	0,208	0,238	0,264	0,295	0,317
26	0,204	0,233	0,259	0,290	0,311
27	0,200	0,229	0,254	0,284	0,305
28	0,197	0,225	0,250	0,279	0,300
29	0,193	0,221	0,246	0,275	0,295
30	0,190	0,218	0,242	0,270	0,290
35	0,177	0,202	0,224	0,251	0,269
40	0,165	0,189	0,210	0,235	0,252
45	0,156	0,179	0,198	0,222	0,238
50	0,148	0,170	0,188	0,211	0,226
55	0,142	0,162	0,180	0,201	0,216
60	0,136	0,155	0,172	0,193	0,207
65	0,131	0,149	0,166	0,185	0,199
70	0,126	0,144	0,160	0,179	0,192
75	0,122	0,139	0,154	0,173	0,185
80	0,118	0,135	0,150	0,167	0,179
85	0,114	0,131	0,145	0,162	0,174
90	0,111	0,127	0,141	0,158	0,169
95	0,108	0,124	0,137	0,154	0,165
100	0,106	0,121	0,134	0,150	0,161
Pendekatan	$1,07/\sqrt{n}$	$1,22/\sqrt{n}$	$1,36/\sqrt{n}$	$1,52/\sqrt{n}$	$1,63/\sqrt{n}$

[Sumber: Greasley 2008: 135.]

Keterangan: Nilai yang diambil adalah $D = 0,409$ (angka berwarna merah)

Jumlah sampel 10 dengan derajat kepercayaan 0,05

Lampiran 2

Tabel nilai t

Pr	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001
df	0.50	0.20	0.10	0.050	0.02	0.010	0.002
1	1.00000	3.07768	6.31375	12.70620	31.82052	63.65674	318.30884
2	0.81650	1.88562	2.91999	4.30265	6.96456	9.92484	22.32712
3	0.76489	1.63774	2.35336	3.18245	4.54070	5.84091	10.21453
4	0.74070	1.53321	2.13185	2.77645	3.74695	4.60409	7.17318
5	0.72669	1.47588	2.01505	2.57058	3.36493	4.03214	5.89343
6	0.71756	1.43976	1.94318	2.44691	3.14267	3.70743	5.20763
7	0.71114	1.41492	1.89458	2.36462	2.99795	3.49948	4.78529
8	0.70639	1.39682	1.85955	2.30600	2.89646	3.35539	4.50079
9	0.70272	1.38303	1.83311	2.26216	2.82144	3.24984	4.29681
10	0.69981	1.37218	1.81246	2.22814	2.76377	3.16927	4.14370
11	0.69745	1.36343	1.79588	2.20099	2.71808	3.10581	4.02470
12	0.69548	1.35622	1.78229	2.17881	2.68100	3.05454	3.92963
13	0.69383	1.35017	1.77093	2.16037	2.65031	3.01228	3.85198
14	0.69242	1.34503	1.76131	2.14479	2.62449	2.97684	3.78739
15	0.69120	1.34061	1.75305	2.13145	2.60248	2.94671	3.73283
16	0.69013	1.33676	1.74588	2.11991	2.58349	2.92078	3.68615
17	0.68920	1.33338	1.73961	2.10982	2.56693	2.89923	3.64577
18	0.68836	1.33039	1.73406	2.10092	2.55238	2.87844	3.61048
19	0.68762	1.32773	1.72913	2.09302	2.53948	2.86093	3.57940
20	0.68695	1.32534	1.72472	2.08596	2.52798	2.84534	3.55181
21	0.68635	1.32319	1.72074	2.07961	2.51765	2.83136	3.52715
22	0.68581	1.32124	1.71714	2.07387	2.50832	2.81876	3.50499
23	0.68531	1.31946	1.71387	2.06866	2.49987	2.80734	3.48496
24	0.68485	1.31784	1.71088	2.06390	2.49216	2.79694	3.46678
25	0.68443	1.31635	1.70814	2.05954	2.48511	2.78744	3.45019
26	0.68404	1.31497	1.70562	2.05553	2.47863	2.77871	3.43500
27	0.68368	1.31370	1.70329	2.05183	2.47266	2.77068	3.42103
28	0.68335	1.31253	1.70113	2.04841	2.46714	2.76326	3.40816
29	0.68304	1.31143	1.69913	2.04523	2.46202	2.75639	3.39624
30	0.68276	1.31042	1.69726	2.04227	2.45726	2.75000	3.38518
31	0.68249	1.30946	1.69552	2.03951	2.45282	2.74404	3.37490
32	0.68223	1.30857	1.69389	2.03693	2.44868	2.73848	3.36531
33	0.68200	1.30774	1.69236	2.03452	2.44479	2.73328	3.35634
34	0.68177	1.30695	1.69092	2.03224	2.44115	2.72839	3.34793
35	0.68156	1.30621	1.68957	2.03011	2.43772	2.72381	3.34005
36	0.68137	1.30551	1.68830	2.02809	2.43449	2.71948	3.33262
37	0.68118	1.30485	1.68709	2.02619	2.43145	2.71541	3.32563
38	0.68100	1.30423	1.68595	2.02439	2.42857	2.71156	3.31903
39	0.68083	1.30364	1.68488	2.02269	2.42584	2.70791	3.31279
40	0.68067	1.30308	1.68385	2.02108	2.42326	2.70446	3.30688

[Sumber: Greasley 2008: 144.]

Keterangan: Nilai t yang diambil adalah 1,833 (angka berwarna merah)
Jumlah sampel 10 (df = 9) dengan derajat kepercayaan 0,05

Lampiran 3

Hasil analisis data dengan software SPSS 16

1. Kreatinin

1.1. Uji Normalitas

Ho = Data berdistribusi normal

H1 = Data tidak berdistribusi normal

Ho diterima jika nilai D Absolut < nilai tabel KS (0,490 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov (KS)

		Estrus	Nonestrus
N		10	10
Parameter Normalitas	Rerata	0,2330	0,2470
	Standar Deviasi	0,15254	0,12632
Nilai Ekstrim	Absolut	0,260	0,193
	Positif	0,260	0,154
	Negatif	-0,210	-0,193
Kolmogorov-Smirnov Z		0,822	0,609
<i>Asymp. Sig. (2-tailed)</i>		0,509	0,852

a. Uji distribusi normal.

Nilai D absolut (warna merah) < tabel yaitu 0,260 (estrus) dan 0,193 (non estrus) < 0,409. Jadi data berdistribusi normal (Ho diterima).

1.2 Uji T Berpasangan

Ho = Tidak ada perbedaan antara estrus dan non estrus

H1 = Ada perbedaan antara estrus dan non estrus

Ho diterima jika nilai t hitung < t tabel (t tabel = 1,833 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Sampel Berpasangan

	Nilai Perbedaan pasangan					T	df	Sig, (2-tailed)
	Rerata	Standar deviasi	Rarata standar error	Derajat kepercayaan 95%				
				bawah	Atas			
1 Estrus – Non Estrus	-0,01400	0,16834	0,05323	-0,13442	0,10642	0,263	9	0,798

Kesimpulan nilai t hitung (warna merah) < t tabel yaitu $0,263 < 1,833$ jadi Ho diterima yaitu tidak ada perbedaan bermakna antara nilai estrus dan non estrus.

2. Kortikosteron

2.1. Gugus Hidroksil

2.1.1. Uji Normalitas

Ho = Data berdistribusi normal

H1 = Data tidak berdistribusi normal

Ho diterima jika nilai D Absolut < nilai tabel KS (0,490 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov (KS)

		Estrus	NonEstrus
N		10	10
Parameter Normalitas	Rerata	8,69250	8,76230
	Standar Deviasi	3,208975	2,929104
Nilai Ekstrim	Absolut	0,160	0,200
	Positif	0,160	0,179
	Negatif	-0,140	-0,200
Kolmogorov-Smirnov Z		0,507	0,633
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,960	0,817

a. Uji distribusi normal.

Nilai D absolut (warna merah) < tabel yaitu 0,160 (estrus) dan 0,200 (non estrus) < 0,409. Jadi data berdistribusi normal (Ho diterima).

2.1.2 Uji T Berpasangan

Ho = Tidak ada perbedaan antara estrus dan non estrus

H1 = Ada perbedaan antara estrus dan non estrus

Ho diterima jika nilai t hitung < t tabel (t tabel = 1,833 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Sampel Berpasangan

	Nilai Perbedaan pasangan					T	df	Sig, (2-tailed)
	Rerata	Standar deviasi	Rarata standar error	Derajat kepercayaan 95%				
				bawah	Atas			
1 Estrus – Non Estrus	-0,069800	4,712751	1,490303	-3,441099	3,301499	0,047	9	0,964

Kesimpulan nilai t hitung (warna merah) < t tabel yaitu 0,047 < 1,833 jadi Ho diterima yaitu tidak ada perbedaan bermakna antara nilai estrus dan non estrus.

2.2. Gugus Alkohol

2.2.1 Uji Normalitas

Ho = Data berdistribusi normal

H1 = Data tidak berdistribusi normal

Ho diterima jika nilai D Absolut < nilai tabel KS (0,490 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov (KS)

		Estrus	Non Estrus
N		10	10
Parameter Normalitas	Rerata	7,96020	7,94200
	Standar Deviasi	1,921338	2,43249
Nilai Ekstrim	Absolut	0,180	0,296
	Positif	0,106	0,182
	Negatif	-0,180	-0,296
Kolmogorov-Smirnov Z		0,568	0,937
Asymp, Sig. (2-tailed)		0,903	0,344

a. Uji distribusi adalah normal

Nilai D absolut (warna merah) < tabel yaitu 0,180 (estrus) dan 0,296 (non estrus) < 0,409 . Jadi data berdistribusi normal (Ho diterima).

2.2.2 Uji T Berpasangan

Ho = Tidak ada perbedaan antara estrus dan non estrus

H1 = Ada perbedaan antara estrus dan non estrus

Ho diterima jika nilai t hitung < t tabel (t tabel = 1,833 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji sampel berpasangan

	Nilai Perbedaan pasangan					T	Df	Sig. (2-tailed)
	Rerata	Standar Deviasi	Rerata standar error	Derajat kepercayaan 95%				
				Bawah	Atas			
Estrus – Non Estrus	0,01820	2,763381	0,873858	-1,958604	1,995004	0,021	9	0,984

Kesimpulan nilai t hitung (warna merah) < t tabel yaitu $0,021 < 1,833$ jadi Ho diterima yaitu tidak ada perbedaan bermakna antara nilai estrus dan non estrus.

2.3. Gugus Metil

2.3.1. Uji normalitas

Ho = Data berdistribusi normal

H1 = Data tidak berdistribusi normal

Ho diterima jika nilai D Absolut < nilai tabel KS (0,490 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov (KS)

		Estrus	Non Estrus
N		10	10
Parameter Normalitas	Rerata	1,63040	1,76380
	Standar Deviasi	1,172861	0,952422
Nilai Ekstrim	Absolut	0,192	0,175
	Positif	0,192	0,175
	Negatif	-0,150	-0,147
Kolmogorov-Smirnov Z		0,607	0,554
Asymp, Sig. (2-tailed)		0,855	0,918

a. Uji distribusi adalah normal

Nilai D absolut (warna merah) < tabel yaitu 0,192(estrus) dan 0,175 (non estrus)

< 0,409. Jadi data berdistribusi normal (Ho diterima).

2.3.2. Uji T Berpasangan

Ho = Tidak ada perbedaan antara estrus dan non estrus

H1 = Ada perbedaan antara estrus dan non estrus

Ho diterima jika nilai t hitung < t tabel (t tabel = 1,833 (N = 10, $\alpha = 0,05$))

Uji sampel berpasangan

	Perbedaan pasangan					T	Df	Sig. (2-tailed)
	Retata	Standar Deviasi	Rerata Standar Error	Derajat Kepercayaan 95%				
				Bawah	Atas			
Estrus – NonEstrus	-0.133400	1,681538	0,531749	-1,336300	1,069500	0,251	9	0,808

Kesimpulan nilai t hitung (warna merah) < t tabel yaitu $0,251 < 1,833$ jadi Ho diterima yaitu tidak ada perbedaan bermakna antara nilai estrus dan non estrus.