

B/FAH
2001
0029

**PERSENTASE JENIS-JENIS LEKOSIT
PADA TIAP FASE SIKLUS REPRODUKSI
TIKUS PUTIH (*Rattus sp.*)**

SKRIPSI

Oleh :

**ALBERTUS TEGUH MULJONO
B01495128**



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

Jika kamu melakukan sesuatu...

**lakukanlah untukmu
hanya buatmu**

**bukan karena ayahmu
atau untuk gurumu**

**bukan buat ibumu
bahkan demi Tuhanmu**

**bukan untuk temanmu
pula bagi sahabatmu....**

**dan juga...
bukan untukku**

**hanya...
buatmu**

RINGKASAN

ALBERTUS TEGUH MULJONO. B01495128. SKRIPSI. Persentase Jenis-Jenis Lekosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*). Di bawah bimbingan : drh. Hera Maheshwari, MSc dan dra. Nastiti Kusumorini, PhD.

Pertumbuhan dan perkembangbiakan organ-organ kelamin betina sewaktu pubertas dipengaruhi oleh hormon-hormon gonadotropin dan kelenjar endokrin lainnya melalui hormon-hormon yang dihasilkannya. Pada hewan betina, pubertas biasanya ditandai dengan munculnya estrus dan ovulasi. Siklus reproduksi umumnya dibagi atas empat fase/periode, yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus. Reproduksi pada hewan betina merupakan suatu proses yang kompleks dan dapat terganggu pada berbagai stadium sebelum dan sesudah permulaan siklus reproduksi. Gangguan dapat berupa invasi bakteri dan invasi mikrobial lainnya. Dinyatakan oleh Dellman and Brown (1976), serta Watts *et al.* (1978), bahwa pada fase proestrus dan estrus saluran reproduksi tubuler sering diinvasi oleh bakteri. Dinyatakan juga oleh Junqueira and Cainero (1980), bahwa pada fase-fase tertentu siklus menstruasi pada wanita, lekosit biasanya menginvasi epitel dan masuk ke dalam lumen vagina. Fungsi lekosit dalam hal ini diduga adalah sebagai respon imunitas tubuh terhadap infeksi dan peradangan akut yang ringan (Kurniasih, 1999). Lekosit dapat dijumpai dalam darah, biasanya karena sel-sel ini diangkut dari sumsum tulang atau jaringan limfoid menuju ke daerah-daerah tubuh yang membutuhkan sel-sel darah putih tersebut (Guyton, 1986).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase jenis-jenis lekosit pada tiap fase siklus reproduksi dari tikus putih (*Rattus sp.*) galur Sprague Dawley yang telah diadaptasikan pada lingkungan Indonesia.

Tikus putih betina (*Rattus sp.*) galur Sprague Dawley yang telah mencapai dewasa kelamin (berumur 8 minggu) sebanyak 20 ekor digunakan sebagai hewan percobaan. Darah tikus-tikus tersebut diambil melalui vena coccygeae untuk dibuat preparat ulas darah setelah sebelumnya ditentukan fase siklus reproduksinya. Preparat ulas darah diperiksa di bawah mikroskop untuk dihitung jumlah sel darah putih (lekosit) yang terdiri dari netrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit dengan pewarnaan Giemsa. Hasil penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan nyata pada persentase lekosit granulosit (basofil, eosinofil, dan netrofil) selama siklus reproduksi. Perbedaan nyata selama siklus reproduksi terlihat pada lekosit agranulosit, yaitu limfosit dan monosit. Limfosit nampak tinggi saat proestrus dan rendah pada diestrus. Peningkatan monosit yang nyata terlihat pada estrus.

**PERSENTASE JENIS-JENIS LEKOSIT
PADA TIAP FASE SIKLUS REPRODUKSI
TIKUS PUTIH (*Rattus* sp.)**

Oleh :

**ALBERTUS TEGUH MULJONO
B01495128**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan
pada Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor**

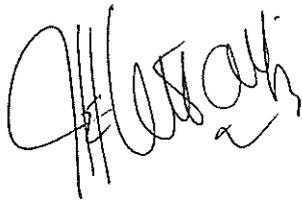
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

Judul : **PERSENTASE JENIS-JENIS LEKOSIT PADA
TIAP FASE SIKLUS REPRODUKSI TIKUS
PUTIH (*Rattus sp.*)**

Nama Mahasiswa : **Albertus Teguh Muljono**

Nomor Pokok : **B01495128**

Telah diperiksa dan disetujui oleh :

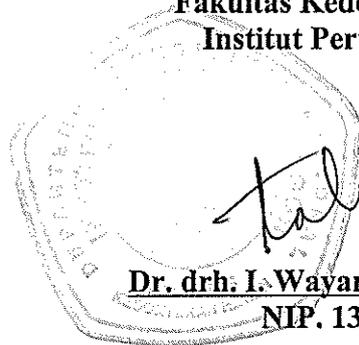


drh. Hera Maheshwari, MSc
Dosen Pembimbing I



dra. Nastiti Kusumorini, PhD
Dosen Pembimbing II

Mengetahui :
Pembantu Dekan I
Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor



Dr. drh. I. Wayan T. Wibawan, MS
NIP. 131129090

Tanggal :

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Semarang, Jawa Tengah pada tanggal 17 Mei 1977 dari ayah Paulus Hendro Muljono dan ibu Lucia Mike Handayani. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara.

Pendidikan dasar berhasil diselesaikan pada tahun 1989 di SD Bernardus IV. Penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama Domenico Savio dan lulus pada tahun 1992. Tahun 1992 penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas Sedes Sapientiae. Seluruh jenjang pendidikan diatas dijalani di kota kelahirannya, sampai pada tahun 1993 penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di Sekolah Menengah Atas Mardi Yuana, Bogor.

Penulis diterima sebagai Mahasiswa Institut Pertanian Bogor pada tahun 1995 tanpa ujian saringan melalui Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI) di Fakultas Kedokteran Hewan.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kasih penulis panjatkan karena hanya dengan berkat dan penyerahan-Nya yang senantiasa dilimpahkan penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian akhir guna memperoleh gelar sarjana kedokteran hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih pada :

1. Ibu drh. Hera Maheshwari, MSc. dan Ibu dra. Nastiti Kusumorini, Phd. serta Ibu drh. Aryani Sismin Satyaningtjas, MSc. yang dalam kesibukannya masih sudi meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan dan memberi saran positif kepada penulis sejak awal penelitian dilaksanakan hingga diselesaikannya skripsi ini.
2. Seluruh Staff di Jurusan Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB atas segala bantuannya.
3. Tutut dan Tio, untuk kerjasama yang baik dari awal penelitian sampai tersusunnya skripsi ini.
4. Papa, Mama, Deasy dan Laura, yang senantiasa mengalirkan sayang, dorongan, doa dan cinta.
5. Imee, untuk ceria dan setianya mengingatkan, membantu, serta menemani selama penyusunan skripsi ini.

6. Bang Abdon, Yoyon, Wisnu, Bob, Rina, Reni, Rukka, juga semua keluargaku di Forest Watch Indonesia dan Telapak, atas perhatian, cercaan dan kepedulian, serta kemesraannya.
7. Nonikku, atas segala keindahanmu.
8. Leo, Arbi, Ika, Winda, Kuya, Heni, Ony, Atin, Kirul, Miki, Ode, Ruri, Didit, serta semua sahabatku, untuk keberadaan dan pengertiannya atas diriku, apa adanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, kritik serta saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Akhir kata, semoga apa yang penulis sajikan dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi mereka yang memerlukan dan dapat memberikan sedikit sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Bogor, Mei 2001

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
PENDAHULUAN	1
1. Latar Belakang	1
2. Tujuan	2
3. Manfaat	3
TINJAUAN PUSTAKA	4
1. Hormon-Hormon Reproduksi	4
2. Siklus Reproduksi	6
2.1. Organ Reproduksi Tikus	10
2.2. Siklus Reproduksi Tikus	11
2.3. Kerja Hormon Reproduksi Pada Tikus	14
3. Lekosit	15
3.1. Netrofil	16
3.2. Eosinofil	18

3.3. Basofil	20
3.4. Limfosit	20
3.5. Monosit	23
METODE	25
1. Umum	25
2. Metode Penelitian	25
2.1. Penentuan Fase Siklus Reproduksi dengan Pemeriksaan Preparat	
Ulas Vagina.....	25
2.1.1. Pengambilan Sampel Preparat Ulas Vagina	25
2.1.2. Pemeriksaan Preparat Ulas Vagina	26
2.2. Pembuatan Preparat Ulas Darah	28
2.3. Pemeriksaaan Preparat Ulas darah	28
3. Analisis Data	29
HASIL DAN PEMBAHASAN	31
1. Netrofil	32
2. Eosinofil	34
3. Basofil	35
4. Limfosit	37
5. Monosit	39
KESIMPULAN DAN SARAN	41
1. Kesimpulan	41
2. Saran	41

DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Data Biologis Tikus	12
2.2. Tipe-tipe Sel Yang Terlihat Pada Preparat Ulas Vagina.....	13
4.1. Rataan Persentase Jenis-Jenis Lekosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Hormon-Hormon Reproduksi	4
3.1 Fase Siklus Reproduksi	27
3.2. Jenis-Jenis Lekosit	30
4.1. Grafik Persentase Jenis-Jenis Lekosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	32
4.2. Grafik Persentase Netrofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	33
4.3. Grafik Persentase Eosinofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	34
4.4. Grafik Persentase Basofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	36
4.5. Grafik Persentase Limfosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	38
4.6. Grafik Persentase Monosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (<i>Rattus sp.</i>)	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penghitungan Netrofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih	46
2. Penghitungan Eosinofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih	48
3. Penghitungan Basofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih	50
4. Penghitungan Limfosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih	52
5. Penghitungan Monosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih	57

I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Reproduksi hewan adalah suatu kemewahan fungsi tubuh yang secara fisiologik tidak vital bagi kehidupan individual tetapi sangat penting bagi kelanjutan keturunan suatu jenis atau bangsa hewan (Toelihere, 1981). Pada umumnya reproduksi baru dapat berlangsung sesudah hewan mencapai masa pubertas.

Pubertas dapat didefinisikan sebagai umur atau waktu dimana organ-organ reproduksi mulai berfungsi dan perkembangbiakan dapat terjadi (Toelihere, 1981). Pertumbuhan dan perkembangbiakan organ-organ kelamin betina sewaktu pubertas dipengaruhi oleh hormon-hormon gonadotropin dan kelenjar endokrin melalui hormon-hormon yang dihasilkannya. Pada hewan betina, pubertas biasanya ditandai dengan munculnya estrus dan ovulasi.

Sekali pubertas telah tercapai dan musim reproduksi telah dimulai, estrus akan terjadi pada hewan betina tidak bunting menurut suatu siklus ritmik yang khas. Interval antara timbulnya satu periode birahi ke permulaan periode birahi berikutnya dikenal sebagai suatu siklus reproduksi. Siklus reproduksi umumnya dibagi atas empat fase/periode, yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus.

Reproduksi pada hewan betina merupakan suatu proses yang kompleks dan dapat terganggu pada berbagai stadium sebelum dan sesudah permulaan siklus reproduksi. Gangguan dapat berupa invasi bakteri dan invasi mikrobial lainnya. Dinyatakan oleh Dellman and Brown (1976) serta Watts *et al.* (1978), bahwa pada fase proestrus dan estrus saluran reproduksi tubuler sering diinvasi oleh bakterial.

Dinyatakan juga oleh Junqueira and Carneiro (1980), bahwa pada fase-fase tertentu siklus menstruasi pada wanita, lekosit biasanya menginvasi epitel dan masuk ke dalam lumen vagina. Fungsi lekosit dalam hal ini diduga sebagai respon imunitas tubuh terhadap infeksi dan peradangan akut yang ringan (Kurniasih, 1999). Lekosit dapat dijumpai dalam darah karena sel-sel ini diangkut dari sumsum tulang atau jaringan limfoid menuju ke daerah-daerah tubuh yang membutuhkan sel-sel darah putih tersebut (Guyton, 1986).

Tikus merupakan hewan yang telah dikenal sebagai salah satu hewan percobaan yang memiliki banyak kelebihan dan keuntungan. Kelebihannya antara lain adalah lebih cepat menjadi dewasa dibanding tikus liar, tidak memperlihatkan perkawinan musiman dan umumnya lebih mudah berkembang biak.

Tikus galur Sprague-Dawley paling besar dari *Rattus norvegicus*, yang mencapai dewasa kelamin pada umur 8 minggu dari 2-3 tahun masa hidupnya. Tikus ini bersifat lebih resisten terhadap penyakit dan memiliki siklus reproduksi yang relatif cepat, yaitu sekitar 4-5 hari, sehingga sering dipilih untuk dijadikan hewan percobaan pada penelitian yang berhubungan dengan siklus reproduksi.

2. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui persentase jenis-jenis lekosit pada tiap fase siklus reproduksi tikus putih (*Rattus sp.*) galur Sprague Dawley yang telah diadaptasikan pada lingkungan Indonesia.

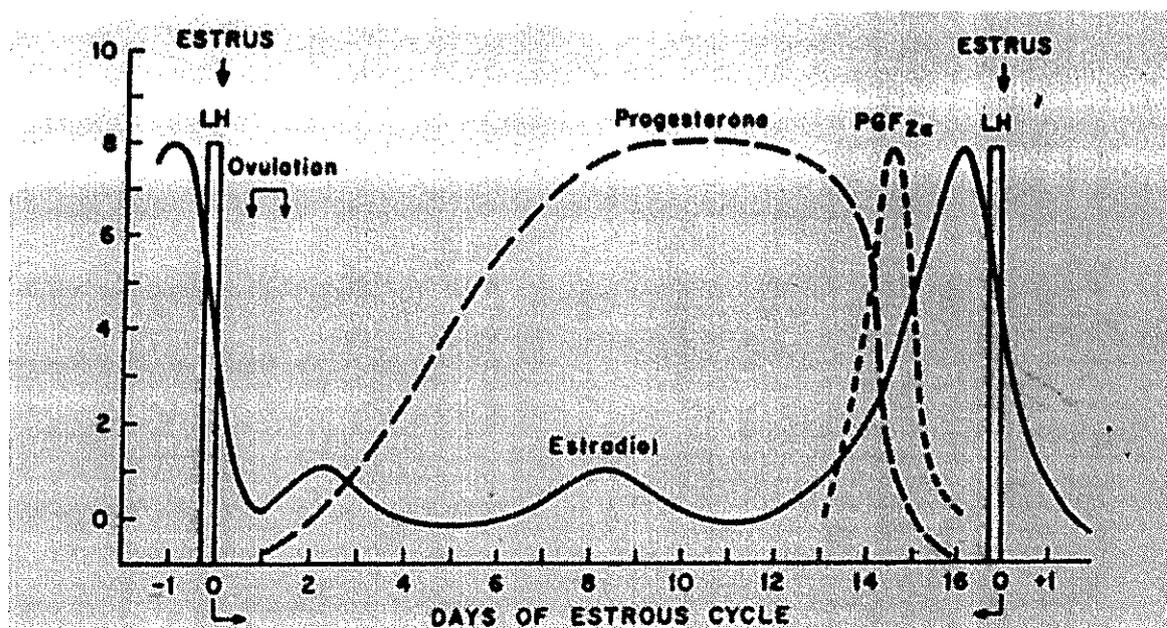
3. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan bagi penelitian-penelitian lanjutan mengenai persentase jenis-jenis leukosit pada tiap fase siklus reproduksi tikus.

II. TINJAUAN PUSTAKA

1. Hormon-Hormon Reproduksi

Aktivitas reproduksi betina dimulai dengan perkembangbiakan ovum di dalam ovarium. Perubahan ovarium selama siklus seksual tergantung seluruhnya pada hormon-hormon gonadotropin yang disekresi oleh kelenjar hipofise anterior (Toelihere, 1981).



Sumber: McDonald, 1980

Gambar 2.1. Hormon-Hormon Reproduksi

Pelepasan FSH ke dalam aliran darah menjelang pubertas menstimulasi pertumbuhan folikel-folikel pada ovarium. FSH dan LH akan bekerjasama untuk merangsang pematangan folikel dan pelepasan estrogen. Sesudah pematangan folikel, LH menyebabkan terjadinya ovulasi dengan menggerak pemecahan dinding sel dan pelepasan ovum (Gambar 2.1). Selain itu, menurut McDonald (1980) LH

juga ikut berpengaruh terhadap pembentukan korpus luteum yang berasal dari folikel yang sudah pecah. Sekresi LH yang terus-menerus mungkin penting untuk mempertahankan korpus luteum dan sekresi progesteron sehingga kebuntingan dapat dipertahankan.

Sewaktu folikel-folikel di dalam ovarium tersebut bertumbuh dan menjadi matang, berat ovarium meninggi dan estrogen disekresikan dari dalam ovarium untuk dilepaskan ke dalam aliran darah. Estrogen menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan saluran kelamin betina, serta menimbulkan estrus atau birahi pada hewan betina (Guyton, 1986; Toelihere, 1981). Hormon estrogen ini disekresikan oleh teka interna dari folikel de Graaf. Jaringan teka interna kaya akan estrogen dan memperlihatkan aktivitas yang maksimum selama fase estrogenik dari siklus reproduksi. Cairan folikuler juga kaya akan estrogen, mungkin karena difusi dari jaringan teka. Estrogen meningkatkan laju migrasi leukosit ke dalam lumen uterus dan meningkatkan aktivitas bakterisida pada organ genitalia selama estrus (Toelihere, 1981). Wira and Sullivan (1985) juga menyatakan bahwa bakteri bertambah di vagina, terutama sekitar ovulasi ketika sekresi estrogen tinggi.

Fungsi estrogen sulit dipisahkan dari hormon-hormon lain seperti progesteron. Estrogen secara normal bekerjasama dengan progesteron dan steroid-steroid lainnya, dan menghasilkan hanya sedikit pengaruh-pengaruh khusus bila bekerja sendiri (Toelihere, 1981). Dalam konsep klasik, pengaturan sekresi progesteron menunjukkan bahwa sesudah ovulasi yang disebabkan oleh LH terbentuklah korpus hemoragikum di dalam ovarium yang kemudian berkembang menjadi korpus luteum. Korpus luteum dibentuk dan dipertahankan oleh prolaktin

dari adenohipofisa (Donalson and Hansel, 1967). Dibawah pengaruh prolaktin, sel-sel lutein menghasilkan progesteron. Secara umum fungsi progesteron adalah menstimulasi diferensiasi jaringan untuk persiapan kebuntingan. Progesteron juga mempunyai kemampuan untuk menghambat respon mediator T limfosit yang terlibat dalam penolakan jaringan (McDonald, 1980).

Aktivitas hormon-hormon di atas bertanggung jawab untuk terjadinya estrus dan ovulasi pertama pada hewan betina muda, dan bertanggung jawab pula terhadap periode-periode estrus berikutnya (Toelihere, 1981).

2. Siklus Reproduksi

Sekali pubertas telah tercapai dan musim reproduksi telah dimulai, estrus akan terjadi pada hewan betina tidak bunting menurut suatu siklus ritmik yang khas. Rentang antara timbulnya satu periode birahi ke permulaan periode birahi berikutnya dikenal sebagai suatu siklus reproduksi (Toelihere, 1981). Rentang ini disertai oleh suatu seri perubahan-perubahan fisiologik di dalam saluran kelamin.

Setiap spesies mempunyai ciri-ciri khas dari pola siklus reroduksinya, namun pada dasarnya adalah sama. Siklus reproduksi umumnya dibagi atas 4 fase atau periode, yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Guyton, 1986; McDonald, 1980; Toelihere, 1981). Beberapa penulis memilih pembagian siklus reproduksi atas 2 fase, yaitu fase folikuler atau estrogenik yang meliputi proestrus dan estrus, serta fase luteal atau progestational yang terdiri dari metestrus dan diestrus.

Proestrus adalah fase sebelum estrus yaitu periode dimana folikel de Graaf bertumbuh dibawah pengaruh FSH dan menghasilkan sejumlah estradiol yang makin bertambah (McDonald, 1980). Sistem reproduksi memulai persiapan-persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium. Folikel atau folikel-folikel, tergantung pada spesies, mengembang dan diisi dengan cairan folikuler. Setiap folikel bertumbuh cepat menjelang periode estrus. Pada periode ini terjadi peningkatan pertumbuhan sel-sel dan lapisan bersilia pada tuba fallopii, vaskularisasi mukosa uteri, vaskularisasi epitel vagina dan penandukan yang terjadi pada beberapa spesies (Toelihere, 1981). Serviks mengalami relaksasi secara bertahap dan makin banyak mensekresikan mukus yang tebal dan berlendir. Mukus tersebut disekresikan oleh sel-sel goblet pada serviks, vagina anterior, serta dari kelenjar-kelenjar uterus. Cairan lumen yang terdapat di organ-organ reproduksi berhubungan dengan aktivitas pertahanan antibakteri (Stzemienski *et al.*, 1984). Pada akhir proestrus, sekresi estrogen ke dalam urin meninggi dan mulai terjadi penurunan konsentrasi progesteron di dalam darah (Guyton, 1986). Korpus luteum dari periode terdahulu mengalami vakuolisasi degenerasi dan pengecilan secara cepat. Peningkatan pertumbuhan jaringan-jaringan epitel, aktivitas muskulator saluran reproduksi, sekresi mukus, dan vaskularisasi endometrium dan mukosa vagina dikenal sebagai periode pembangunan (Toelihere, 1981). Perubahan-perubahan ke arah pembangunan ini disebabkan oleh sekresi estradiol yang makin meninggi. Pada akhir proestrus hewan betina biasanya memperlihatkan perhatiannya pada hewan jantan.

Estrus adalah periode yang ditandai oleh keinginan birahi dan penerimaan pejantan oleh hewan betina (Toelihere, 1981). Selama periode ini umumnya hewan

betina akan mencari dan menerima pejantan untuk berkopulasi. Pada periode ini ovum mengalami perubahan-perubahan ke arah pematangan (Guyton, 1986; McDonald, 1980) dimana folikel de Graaf membesar dan menjadi matang (Guyton, 1986). Estradiol dari folikel de Graaf yang matang menyebabkan perubahan-perubahan pada saluran reproduksi tubuler yang maksimal pada fase ini (Wira and Sullivan, 1985). Tuba fallopii menegang, epitel menjadi matang, dan silia aktif, serta terjadi kontraksi tuba fallopii dan ujung tuba yang berfimbria merapat ke folikel de Graaf. Pada periode ini, sekresi cairan tuba bertambah, uterus tegang, dan mukosa tumbuh dengan cepat, serta lendir disekresikan. Stroma mengalami pembengkakan, dan netrofil banyak terlihat di dinding subepitel (Toelihere, 1981). Serviks mengendor dan mengalami oedematous, lendir serviks dan vagina bertambah, serta mukosa berwarna merah jambu dan terjadi kongesti karena vaskularisasi yang bertambah. Mukosa vagina sangat menebal dan pada beberapa spesies banyak sel-sel epitel berkornifikasi yang tanggal. Vulva mengendor dan oedematous. Menjelang akhir estrus mungkin terjadi kenaikan jumlah leukosit yang berpindah ke dalam lumen uterus (Toelihere, 1981). Pada kebanyakan spesies, ovulasi terjadi menjelang akhir periode estrus (Bivin, *et al.*, 1985; Guyton 1986) dimana terjadi hemoragi di membran folikel, dan terdapat peningkatan vaskularisasi dari darah ke liquor folikuli saat menjelang ovulasi (McDonald, 1980). Penerimaan terhadap pejantan selama estrus disebabkan oleh pengaruh estradiol pada sistem syaraf pusat yang menghasilkan pola-pola kelakuan yang khas pada berbagai hewan betina (Toelihere, 1985). Kelakuan kelamin jantan atau betina tidak khas bagi satu jenis kelamin dan

pada kondisi-kondisi tertentu setiap jenis kelamin dapat memperlihatkan kelakuan kelamin lainnya.

Metestrus atau post estrus adalah periode segera sesudah estrus di mana korpus luteum bertumbuh cepat dari sel-sel granulosa folikel yang telah pecah dibawah pengaruh LH dari adenohipofisa (McDonald, 1980). Korpus luteum merupakan salah satu organ tubuh yang mempunyai banyak vaskularisasi. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum (Toelihere, 1981; Guyton, 1986). Progesteron menghambat sekresi FSH oleh adenohipofisa sehingga menghambat pembentukan folikel de Graaf yang lain dan mencegah terjadinya estrus. Selama metestrus uterus mengadakan persiapan-persiapan seperlunya untuk menerima dan memberi makan pada embrio (Guyton, 1986). Pada masa ini dinding subepitel endometrium terinfiltrasi dengan netrofil dan eosinofil (McDonald, 1980). Apabila kebuntingan tidak terjadi, uterus dan saluran reproduksi selebihnya kembali ke keadaan yang kurang aktif yang sama sebelum proestrus, yaitu diestrus (Toelihere, 1981).

Diestrus adalah periode terakhir dan terlama siklus reproduksi pada mamalia. Pada periode ini, korpus luteum menjadi matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi nyata, endometrium lebih menebal dan kelenjar-kelenjar berhipertrofi (Toelihere, 1981), invasi netrofil dan eosinofil menjadi maksimal pada endometrium (McDonald, 1980), serviks menutup dan otot uterus mengendor (Guyton, 1986). Pada akhir periode ini korpus luteum memperlihatkan perubahan dan vakuolisasi secara bertahap karena dibentuknya substansi luteolitik oleh endometrium hewan yang tidak bunting, yaitu prostaglandin, yang berdifusi dari

vena uterus langsung ke dalam arteri ovarium (Toelihere, 1981). Endometrium dan kelenjar-kelenjarnya beratrophi atau kembali ke ukuran semula. Perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder mulai terjadi dan akhirnya kembali ke proestrus.

2.1. Organ Reproduksi Tikus

Oviduk tikus merupakan sepasang pipa yang berliku, masing-masing mempunyai panjang 30 mm dan diameter 0,4-0,5 mm (Leininger and Jokinen, 1990). Di depan oviduk terdapat infudibulum menonjol keluar sampai ke bursa ovari dan terikat pada hilus ovari dan ligamentum. Di oviduk bagian belakang terdapat ostium uterus di puncak dari papila (Leininger and Jokinen, 1990). Lumen oviduk berupa sel kolumnar bersilia lapis tunggal, yang mengandung sel sekresi non silia dan sel murni. Lumen oviduk mengandung cairan yang banyak diproduksi saat metestrus (Leininger and Jokinen, 1990). Selama periode metestrus cairan juga banyak terdapat di ruang periovarium.

Uterus tikus tersusun sebagai sepasang tanduk yang terpisah nyata (uterus dupleks) yang mempunyai bagian kering di belakangnya (Bivin *et al.*, 1979). Masing-masing tanduk mempunyai panjang 30-40 mm, dan bagian belakang sekitar 7- 10 mm panjangnya. Kelenjar-kelenjar uterus tersebar di seluruh endometrium. Kelenjar semakin banyak jumlahnya di cornua uteri dan mengurang ke arah serviks. Kelenjar uterus, dalam bentuk susu uterus mempunyai fungsi penting untuk pemberian makanan kepada embrio sebelum implantasi (Guyton, 1986).

Vagina uteri mempunyai 4 atau 5 epitel pelindung fibromuskular yang mengalasi vaginal lumen dari udara luar yang dapat masuk ke dalam serviks. Vagina

mempunyai panjang 15-20 mm dan dapat menggelembung sampai diameter 5 mm (Leininger and Jokinen, 1990). Daerah dimana dinding vagina bertemu dengan serviks, terdapat *blind end* atau *fornix*. Ulas vagina tikus dapat digunakan untuk menentukan fase siklus birahi (McDonald, 1980). Sekresi mukus di vagina sebagian besar datang dari serviks, karena vagina tidak punya kelenjar.

2.2. Siklus Reproduksi Tikus

Dewasa kelamin tikus terjadi pada umur antara 100-120 hari dengan usia subur diantara umur 100-300 hari (Baker, 1979). Siklus reproduksi biasanya dimulai sekitar umur 77 hari, tetapi mungkin dimulai kapan saja antara umur 45 sampai 147 hari (Baker, 1979). Data biologis lebih lengkap dapat dilihat pada tabel 2.1.

Perubahan vagina pada tikus erat hubungannya dengan siklus estrus, dan berbagai penelitian dari cairan dan sel vagina memberikan metode yang dapat diandalkan untuk menentukan fase ini (McDonald, 1980; Baker, 1979), seperti terlihat pada tabel 2.2.

Selama fase estrus, dinding vagina terlihat kering, putih dan buram, tetapi berubah lembab dan berwarna merah muda selama metestrus. Perubahan ini berhubungan dengan proses pertandukan lapisan permukaan vagina selama estrus dan deskuamasi luas (Baker, 1979).

Tabel 2.1. Data Biologis Tikus

Lama hidup	: 2-3 tahun, dapat sampai 4 tahun
Lama produksi ekonomis	: 1 tahun
Lama bunting	: 20-22 hari
Kawin sesudah beranak	: 1 sampai 24 jam
Umur disapih	: 21 hari
Umur dewasa	: 40-60 hari
Umur dikawinkan	: 10 minggu (jantan dan betina)
Siklus kelamin	: poliestrus
Siklus estrus (birahi)	: 4-5 hari
Lama estrus	: 9-20 jam
Perkawinan	: pada saat estrus
Ovulasi	: 8-11 jam sesudah timbul estrus, spontan
Fertilisasi	: 7-10 jam
Implantasi	: 5-6 hari sesudah fertilisasi
Berat dewasa	: 300-400 g jantan; 250-300 betina.
Berat Lahir	: 5-6 gram
Jumlah anak	: rata-rata 9, dapat 20
Suhu (rektal)	: 36-39°C (rata-rata 37,5°C)
Pernafasan	: 65-115/ menit
Denyut nadi	: 330-480 / menit
Tekanan darah	: 90-180 sistol, 60-145 diastol
Volume darah	: 57-70 ml/kg
Sel darah merah	: $7,2-9,6 \times 10^6 / \text{mm}^3$
Sel darah putih	: $5,0-13,0 \times 10^3 / \text{mm}^3$
Neutrofil	: 9-34%
Limfosit	: 63-84%
Monosit	: 0-5%
Eosinofil	: 0-6%
PCV	: 45-47%
Trombosit	: $150-140 \times 10^3 / \text{mm}^3$
Hb	: 15-16 g / 100 ml

Sumber: Smith dan Mangkoewidjojo (1988)

Tabel 2.2. Tipe-tipe sel yang terlihat pada preparat ulas vagina

Fase dan Durasi	Cairan Vagina	Alat Kelamin Luar
Proestrus (12 jam)	Tampak sel berinti bulat, sampai 75 % sel yang mengalami pertandukan. Estrus mulai ketika tampak 25 % sel yang mengalami pertandukan	Vulva membesar. Vagina kering.
Estrus (12 jam)	Tampak hanya sel-sel yang mengalami pertandukan, atau sel yang mengalami pertandukan tinggal 25% dan mulai tampak sel <i>pavement</i>	Vulva membesar. Vagina kering.
Metestrus (21 jam)	Tampak hanya sel <i>pavement</i> , atau sel <i>pavement</i> dengan lekosit.	Vulva tetap membesar. Vagina bersifat seperti keju.
Diestrus (57 jam)	Sel epitel dan lekosit	Tidak ada pembesaran vulva. Vagina lembab.

Sumber: Baker (1979)

Perubahan histologi di epitelium vagina dan pengelupasan sel berhubungan erat dengan perubahan-perubahan pada siklus reproduksi (Ringler and Dabich, 1979). Lebih lanjut Ringler and Dabich (1979) menyatakan bahwa menjelang proestrus tipe-tipe sel pada cairan vagina mengandung sel epitel berinti dan lekosit, terkadang dengan sel yang mengalami pertandukan. Selama proestrus lekosit menghilang, sel epitel berinti bertambah dan secara bertahap digantikan oleh sel yang mengalami pertandukan. Lekosit tidak terlihat selama proestrus dan estrus karena penebalan epitel mukosa vagina tidak memungkinkan invasi lekosit ke dalam lumen vagina (Kurniasih, 1999).

Awal estrus biasanya terjadi ketika ulas vagina mengandung 75 % sel epitel berinti dan 25 % sel yang mengalami pertandukan, sampai akhirnya hanya sel yang

mengalami pertandukan yang tampak dengan inti yang berdegenerasi (Baker, 1979). Selama tahap akhir dari fase penandukan sel-sel epitel, cairan vagina menjadi berlebihan dan bersifat seperti keju, dan siklus estrus mungkin berakhir pada fase ini. Akhir dari siklus reproduksi diikuti dengan tampaknya banyak leukosit dan hilangnya sel-sel yang mengalami pertandukan (Baker, 1979).

2.3. Kerja hormon reproduksi pada tikus

Terdapat 2 bentuk siklus reproduksi tikus, yaitu siklus 4 hari dan siklus 5 hari (Bivin *et al.*, 1979). LH dalam jumlah sedikit disekresikan pada pertengahan hari ke 3, yang menyebabkan sekresi estrogen. Luteolisis korpus lutea banyak terjadi pada saat ini, kemungkinan karena sekresi LH. Sekresi estrogen dilepaskan pada saat proestrus dan berlangsung sampai sekresi LH, di bawah kontrol susunan saraf pusat. Estrogen bertanggung jawab untuk perubahan uterus dan vagina, tingkah laku kawin dan pengeluaran LH-FSH pada dua hari berikutnya (Bivin *et al.*, 1979). Estrogen juga menyebabkan sekresi FSH dan kemungkinan juga prolaktin.

LH penting untuk memicu ovulasi yang terjadi setelah 14 jam pada hari ke-4. LH ini dikeluarkan dekat pada saat *light dark cycle*, yaitu pada hari saat level estrogen tinggi (Bivin *et al.*, 1979; Toelihere, 1981). LH selain menyebabkan ovulasi, juga menghentikan sekresi estrogen dan memulai sekresi progesteron oleh ovarium.

Progesteron beraksi pada sistem nervus dan membantu terjadinya tingkah laku kawin, juga memicu pengeluaran cairan uterus. Sebagai akibat dari rendahnya sekresi estrogen dan umpan balik negatif pada LH dan FSH, maka sekresi LH dan FSH bertambah, mempertandukan dimulainya perkembangan folikel berikutnya.

Menurut Bivin *et al.* (1979), siklus reproduksi 5 hari mirip dengan siklus 4 hari (Gambar 2.1.). Pada siklus 5 hari ini, sekresi LH dan estrogen keduanya nampak lebih lambat. Luteolisis dan perubahan uterus terjadi lebih lambat \pm 24 jam. Tanda penting untuk memicu pelepasan LH (estrogen dan LH-FSH), biasanya lebih lambat \pm 24 jam, sehingga memperpanjang pengembangan uterus dan pertandukan vagina.

3. Lekosit

Darah merupakan zat yang vital karena fungsinya sebagai pembawa nutrisi dan oksigen untuk seluruh sel tubuh. Darah juga mengandung sel yang secara khusus berfungsi untuk mempertahankan sel-sel dan jaringan tubuh dari infeksi dan penyakit. Darah yang secara normal ditemukan dalam sistem sirkulasi mempunyai karakter dan komposisi yang unik (Martini, 1992).

Komposisi darah terdiri dari plasma darah, platelet dan sel-sel darah. Plasma darah merupakan substansi dasar darah. Darah umumnya mengandung 55 % plasma darah. Plasma darah tersebut sebagian besar terdiri dari air, serta zat-zat elektrolit, dan protein. Adapun platelet merupakan bagian sitoplasma yang mengandung enzim dan zat penting lain yang berperan dalam pembekuan darah. Sedangkan sel darah merah dan sel darah putih merupakan bentuk-bentuk dari sel darah. Sel darah merah berfungsi sebagai transport oksigen dan karbondioksida, dan sel darah putih atau lekosit merupakan komponen penting dari sistem imunitas (Martini, 1992).

Imunitas mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu hewan untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya, untuk menetralkan, menyisihkan

atau memetabolisasi benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri (Bellanti and Kadlec, 1993) dan dalam hal ini fungsi lekosit sangat penting.

Lekosit dikategorikan ke dalam 2 tipe berdasarkan ada tidaknya granula yang spesifik di dalam sitoplasma, yaitu lekosit granulosit, yang mempunyai granula dalam sitoplasma, dan lekosit agranulosit, yang tidak mempunyai granula dalam sitoplasmanya (Bloom and Fawcett, 1975). Berdasarkan banyaknya inti, lekosit digolongkan menjadi lekosit mononuklear, yang hanya mempunyai satu inti dan lekosit polimorfonuklear, yang mempunyai inti lebih dari satu.

3.1. Netrofil

Netrofil merupakan jumlah terbesar jenis lekosit, yaitu dengan 55%-65% dari total lekosit yang ada, namun hanya sekitar 14%-20% pada tikus (Ringler and Dabich, 1979). Netrofil mudah dikenali dengan inti yang mempunyai 2 atau lebih lobus. Banyaknya lobus tergantung pada umur sel tersebut. Ketika sel baru muncul dalam sirkulasi darah, inti sel mempunyai bentuk yang sederhana kemudian terjadi pengerutan menjadi dua bagian. Proses tersebut berlangsung terus sampai akhirnya netrofil dapat mempunyai 5 atau lebih lobus. Dengan ciri-ciri tersebut maka netrofil sering disebut sebagai *leukosit polimorfonuklear*. Banyaknya sel muda netrofil dapat menggambarkan rata-rata masuknya netrofil baru dalam sirkulasi (Bloom and Fawcett, 1975).

Pada sitoplasma netrofil terdapat granula yang sangat kecil yang disebut spesifik granula (Bellanti and Kadlec., 1993; Bloom and Fawcett, 1975). Selain itu

terdapat juga azurofil granula dengan ukuran yang sedikit lebih besar, berwarna merah keunguan. Enzim myeloperoxidase terdapat hanya pada azurofil granula. Selain itu azurofil granula mengandung asam phosphatase, *β -glucoranimidase* sehingga sering disamakan dengan enzim lisosom primer (Bellanti and Kadlec, 1993; Bloom and Fawcett, 1975). Granula spesifik kurang mengandung enzim lisosom tapi mengandung alkaline phosphatase dan mempunyai protein khusus yang disebut phagocytins, yang penting dalam aktivitas antibakterial (Bloom and Fawcett, 1975).

Netrofil bersifat sangat fagositik (Bellanti and Kadlec, 1993). Netrofil mempunyai kapasitas untuk memanjangkan pseudopodia di sekitar bakteri dan partikel asing lain untuk kemudian membawa partikel-partikel tersebut ke dalam sel melalui batas membran vakuola. Azurofil granula bergabung dengan vakuola mengeluarkan enzim hidrolisis untuk menghancurkan mereka. Bagaimana spesifik granula menggunakan kemampuan antibakterialnya belum diketahui banyak (Bloom and Fawcett, 1975).

Netrofil adalah barisan pertama dalam sistem pertahanan tubuh dalam melawan invasi bakteri (Bellanti and Kadlec, 1993). Pada tempat yang mengalami peradangan, netrofil menempel di dinding kapiler atau vena. Netrofil dengan gerak amuboid memungkinkan untuk melewati sel endotelium, berpindah antar jaringan dan melakukan fagositosis kemudian menghancurkan bakteri (Raphael, 1987; Bellanti and Kadlec., 1975). Pada infeksi bakteri selanjutnya, terdapat pesan transmisi untuk sumsum tulang yang memicu bertambahnya produksi dan pengeluaran netrofil (Bloom and Fawcett, 1975). Dalam kondisi ini, netrofil dalam

sirkulasi bertambah dan persentase netrofil dengan inti sederhana meningkat. Nanah yang terakumulasi dalam luka atau abses mengandung berjuta-juta netrofil yang mati dan sekarat. Siklus hidup normal netrofil adalah 8 hari, tetapi sebagian besar dari siklus hidupnya terdapat dalam sumsum tulang.

Selama siklus reproduksi, jumlah netrofil terlihat normal (Robertson *et al.*, 1999). Jumlah netrofil akan meningkat pada fase estrus dan metestrus (Strzemienski *et al.*, 1984; Mathur and Kennedy, 1993; Chun *et al.*, 1993; Cavender and Murdoch, 1988; Brannstrom *et al.*, 1993). Strzemienski *et al.* (1984) menyatakan bahwa cairan lumen uterus berhubungan erat dengan aktivitas pertahanan antibakteri dan *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) teridentifikasi dalam kelenjar dan sel epitel lumen sebagai sumber terbesar GM-CSF.

3.2. Eosinofil

Eosinofil merupakan 1 sampai 4 persen dari populasi lekosit (Ringler and Dabich, 1979). Ukurannya hampir sama dengan netrofil sekitar 9 μm dalam sirkulasi dan sekitar 12 μm dalam preparat ulas kering. Eosinofil mudah dikenali dari spesifik granula kasar yang berwarna merah muda dengan pewarnaan *Wright's Blood* (Bloom and Fawcett, 1975). Inti eosinofil biasanya mempunyai 2 lobus yang saling berhubungan. Kromatin eosinofil sangat tebal dan nukleoli tidak terlihat. Pada tikus, nukleus tidak berbentuk bilobus tetapi seperti cincin tidak beraturan (Ringler and Dabich, 1979). Granula eosinofil mengandung enzim lisosom seperti yang terdapat pada azurofil granula netrofil tetapi mempunyai konsentrasi enzim peroxidase yang lebih tinggi (Bloom dan Fawcett, 1975).

Protein asing dalam tubuh mampu membangkitkan respon eosinofil, walaupun peran secara pasti belum dapat ditentukan. Peningkatan jumlah eosinofil dalam darah terjadi pada berbagai keadaan alergi dan hipersensitif, juga pada infeksi parasit, seperti cacing (Bellanti and Kadlec, 1993; Bloom and Fawcett, 1975).

Fungsi eosinofil secara tepat dalam imun respon belum dapat diketahui, tetapi terdapat kemungkinan bahwa eosinofil berfungsi sebagai selektif fagositosis dan penghancuran antigen-antibodi kompleks (Bloom and Fawcett, 1975). Pengaturan dalam pelepasan eosinofil dari sumsum tulang ke sirkulasi darah juga belum banyak dimengerti. Namun, ada substansi eosinotaktik di tempat-tempat terjadinya reaksi antigen-antibodi dan peradangan jaringan. Kejadian tersebut diduga memicu pengeluaran eosinofil dari sumsum tulang ke sirkulasi, dari sirkulasi mereka berpindah ke jaringan.

Selama siklus reproduksi, eosinofil meningkat seiring peningkatan estrogen (Leiva *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1996; Terada *et al.*, 1985). *E2-dependent eosinophilic chemotactic factor* ditemukan dalam uterus yang merupakan zat kemotaktik bagi eosinofil (Terada *et al.*, 1985). Eosinofil nampak tinggi di sekitar menstruasi pada wanita (Jeziorska *et al.*, 1995), dan banyak ditemukan bersama mononukleus leukosit selama estrus (Gaytan *et al.*, 1991).

3.3. Basofil

Basofil sukar ditemukan dalam darah karena hanya merupakan 0,5 % dari total lekosit (Ringler and Dabich, 1979). Ukuran basofil hampir sama dengan netrofil dan pada preparat ulas kering mempunyai diameter 10 μm . Kumpulan kromatin basofil lebih sedikit dan lebih pucat daripada eosinofil dan nukleoli biasanya tidak terlihat. Pada tikus dan kucing, secara normal basofil sering tidak ada dalam darah. Fungsi basofil yaitu untuk membangkitkan perbarahan akut pada tempat deposisi antigen (Bloom and Fawcett, 1975), sedangkan selama siklus reproduksi, sel basofil terakumulasi dalam fase luteinisasi, metestrus dan diestrus (Cavender and Murdoch, 1988).

3.4. Limfosit

Limfosit merupakan sel kedua yang paling berlimpah pada lekosit, sekitar 20-35 % dari total sel darah putih, namun dapat mencapai 86% pada tikus (Ringler and Dabich, 1979). Limfosit adalah sel kecil dengan nukleus berwarna kuat dan bentuk yang bulat atau melekuk tipis, dengan sitoplasma yang berbentuk lingkaran tipis dan warna biru cerah. Limfosit tidak mempunyai granula yang spesifik, tetapi kadang-kadang terdapat beberapa granula azurofil (Bloom and Fawcett, 1975).

Limfosit secara tradisional terbagi menjadi 3 klasifikasi yaitu limfosit besar, limfosit sedang, dan limfosit kecil (Bellanti and Kadlec, 1993; Bloom and Fawcett, 1975). Limfosit sangat berhubungan erat dengan respon imunologik tubuh. Berbagai bahan asing yang biasanya berupa protein-protein atau polisakarida dapat menyebabkan peningkatan produksi globulin dalam serum yang mampu menetralsir

efek bahaya dari agen penyebab (Bloom and Fawcett, 1975). Hewan yang terlindungi dengan cara seperti ini disebut mempunyai imunitas (Bellanti and Kadlec., 1993). Agen asing yang menyebabkan imun respon disebut antigen dan molekul globulin spesifik yang muncul untuk menetralkan disebut antibodi (Bellanti and Kadlec., 1993). Saat antigen masuk dalam tubuh untuk pertama kali akan menyebabkan produksi sel antibodi yang ditandai dengan peningkatan jumlah per minggu, meskipun masih dalam level rendah. Peristiwa ini disebut respon primer. Jika penyerangan kedua oleh antigen yang sama terjadi seminggu atau sebulan kemudian, terjadi pemunculan cepat dari sintesis globulin antibodi, menyebabkan titer antibodi pada sirkulasi 10 sampai 100 kali level sebelumnya. Hal ini disebut respon kedua, dan jika diberi injeksi antigen, peningkatan level antibodi dalam sirkulasi mungkin bertahan sampai bertahun-tahun (Bloom and Fawcett, 1975). Komponen pertahanan tubuh yang tergantung pada sumsum tulang dan antibodi, disebut sebagai imun respon humoral (Bellanti and Kadlec., 1993; Bloom and Fawcett, 1975).

Limfosit adalah sel yang mengenali antigen sebagai bahan asing dalam tubuh dan merespon pertemuan mereka dengan kemampuan memori spesifik untuk antigen tersebut. Limfosit dibentuk dari limfonodi dan organ lymphoid lainnya, sedangkan leukosit lain dibentuk di sumsum tulang. Pembentukan limfosit baru per hari yang sangat besar, menggambarkan jangka hidup mereka yang pendek, dan jika limfosit yang mati tidak sebanding dengan itu, maka jumlah limfosit dalam tubuh akan sangat meningkat (Bloom and Fawcett, 1975).

Limfosit secara berkesinambungan berpindah antara limfonodi, limpa, antar jaringan dengan menggunakan sirkulasi darah sebagai jalurnya (Bellanti and Kadlec.,

1993). Sebagian besar limfosit merupakan bagian dari *long-lived* limfosit, berpartisipasi dalam sel mediator. Sebagian lagi merupakan *short lived limfosit* yang mempunyai kemampuan memproduksi sel antibodi (Bloom and Fawcett, 1975).

Selama siklus reproduksi, MHC/*Major Histocompatibility Complex* meningkat selama akhir fase luteal (diestrus), dan sel T menginvasi sel luteal (Bukovsky *et al.*, 1995). Selama proestrus, dimana banyak sel T, sel lutein granulosa mengalami regresi sehingga permukaan mengekspresikan banyak penanda makrofag. LH *receptor immunoreactivity* tampak di endothelium pada saat regresi luteum. T limfosit tampak berpartisipasi dalam regresi korpus luteum (Bukovsky *et al.*, 1995). GM-CSF/ *granulocyte macrophage colony stimulating factor* dan IL-6, sangat banyak pada estrus dan hari pertama kehamilan (Robertson *et al.*, 1999). Glandular dan sel epitel lumen teridentifikasi sebagai sumber IL-6 dan GM-CSF. Stromal fibroblast juga mensintesis IL-6. Kedua aktivitas derivat sitokinin dari sel epitel tersebut (IL-6 dan GM-CSF) akan dinetralkan oleh aktivitas spesifik antibodi pada saat proestrus (Robertson *et al.*, 1999). Jeziorska *et al.* (1995) menyatakan bahwa antibodi monoklonal, absen pada hari ke 5- 26 pada siklus menstruasi, dan jika dihubungkan dengan siklus reproduksi maka penampakan antibodi monoklonal hanya terlihat pada saat proestrus dan diestrus. Hal ini dikuatkan oleh pernyataan Gaytan *et al.* (1991) tentang peningkatan antibodi monoklonal pada proestrus. Head *et al.* (1994) menyatakan bahwa NK/ *Natural Killer* meningkat pada proestrus dan estrus, namun tidak muncul pada hewan ovariectomy. NK muncul kembali setelah penambahan estrogen pada hewan percobaan. Penghambatan aktivitas sel NK

endometrium mungkin penting untuk keberhasilan kebuntingan, karena aktivitasnya yang berpotensi untuk menggagalkan konseptus (Liu and Hansen, 1993).

3.5. Monosit

Monosit berukuran 9 sampai 12 μm diameternya, tetapi dalam preparat ulas darah mengembang karena proses pengeringan menjadi 17 μm , dan merupakan 3 % - 8 % dari total leukosit (Ringler and Dabich, 1979). Monosit mempunyai sitoplasma lebih banyak daripada limfosit dan berwarna lebih cerah warna, biru muda, juga mempunyai azurofil granula kecil yang menyebar (Bloom and Fawcett, 1975). Pada monosit matang, nukleus mempunyai posisi yang unik dan oval atau tidak beraturan tersebar pada nukleoplasma, sehingga nukleus tidak terlihat karena warna yang kuat.

Monosit berasal dari promonosit di sumsum tulang, dan setelah mengalami pertumbuhan singkat selama 1 sampai 3 hari, lalu memasuki sirkulasi secara acak. Monosit ditemukan dalam sirkulasi perifer yang menggambarkan perjalanan dari sumsum tulang menuju ke jaringan. Monosit berada hanya 1,5 hari dalam sirkulasi untuk kemudian berpindah ke berbagai organ dalam tubuh (Bloom and Fawcett, 1975). Monosit mempunyai kemampuan mitosis dan mensintesis enzim untuk dikeluarkan ke dalam jaringan (Bellanti and Kadlec., 1993). Monosit terlihat hanya mempunyai sedikit fungsi dalam darah, tetapi dapat hidup lama dalam jaringan. Monosit merupakan lekosit cadangan yang bergerak dengan sistem pertahanan yang kuat yaitu fagositosis dan digestion intraseluler. Monosit juga esensial dalam berbagai proses perkembangan antibodi (Raphael, 1987).



Selama siklus birahi, secara umum perubahan jumlah makrofag seiring dengan aktivitas fungsional dari korpus luteum. Perubahan jumlah dan morfologi makrofag diduga karena adanya hubungan tidak langsung antara makrofag dengan hormon steroid pada korpus luteum (Gaytan *et al.*, 1998). Bukovsky *et al.* (1995) dan Bowen *et al.* (1999) juga menyatakan bahwa makrofag diduga memegang peranan dalam regresi korpus luteum.

Monocyte Chemoattractant Protein-1/ MCP-1, yang bersifat kemotaktik bagi monosit (Penny *et al.*, 1998) terlihat tinggi saat estrus, lebih tinggi dibanding pada saat proestrus (Bowen *et al.*, 1999). Brannstrom *et al.* (1993) menyatakan makrofag terlihat pada proestrus dan makin meningkat saat ovulasi (estrus). Prostaglandin yang diduga disekresikan pada saat diestrus akan meningkatkan *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, hal ini dinyatakan oleh Emond *et al.* (1998).

III. METODE

1. Umum

Penelitian dilakukan di Laboratorim Fisiologi, Jurusan Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor tikus putih (*Rattus sp.*) galur Spraque-Dawley berasal dari Jepang dan sudah diadaptasikan pada lingkungan Indonesia untuk beberapa generasi. Tikus-tikus tersebut berjenis kelamin betina berumur 8 minggu pada saat awal penelitian (dewasa kelamin telah tercapai) dalam kondisi normal dan sehat dengan berat badan rata-rata 200-250 g.

Kedua puluh ekor tikus percobaan tersebut dikandangkan secara terpisah di dalam kandang berbentuk kotak plastik berukuran 30cm x 20cm x 12cm dengan tutup kawat yang mudah dibuka tutup. Alas kandang dialasi dengan litter yang harus diganti setiap 2 hari sekali untuk menjaga agar kondisi kandang tetap kering dan sehat. Selama penelitian pakan dalam bentuk campuran pelet, jagung, dan kacang hijau, serta air minum diberikan secara *ad libitum*.

2. Metode Penelitian

2.1. Penentuan Fase Siklus Reproduksi dengan Pemeriksaan Preparat Ulas Vagina

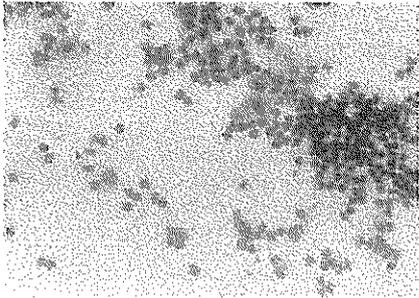
2.1.1. Pengambilan Sampel Preparat Ulas Vagina

Penentuan fase siklus birahi tikus dilakukan dengan mengamati preparat ulas vagina. Pembuatan preparat ulas vagina dilakukan setiap hari (pagi hari) dengan cara

mengulaskan kapas (*cotton bud*) yang telah dibasahi dengan NaCl fisiologis 0,9% ke dalam vagina tikus dan kemudian diulaskan pada gelas objek. Preparat kemudian difiksasi dengan menggunakan metanol 9% selama 5 menit, lalu dicuci dengan aquades. Setelah itu preparat ulas diwarnai dengan cara dicelupkan pada bak pewarna berisi pewarna Giemsa selama 30 menit. Pewarna Giemsa yang dipakai adalah larutan Giemsa E D-61 Darmstadt produksi Merck. Pewarna tersebut terbuat dari sediaan Giemsa 4 gram yang dilarutkan dalam 66 ml gliserol pada suhu 55-60 °C selama 1,5 sampai 2 jam, kemudian ditambahkan 66 ml metanol absolut. Sediaan Giemsa sendiri terbuat dari larutan azur-cosin-GIN Metilen. Sebelum digunakan untuk mewarnai preparat ulas darah dilakukan pengenceran terhadap pewarna Giemsa dengan aquades, perbandingan yang digunakan 1 : 9 (1 ml Giemsa : 9 ml akuades), warna yang dihasilkan adalah merah dadu dan GIN.

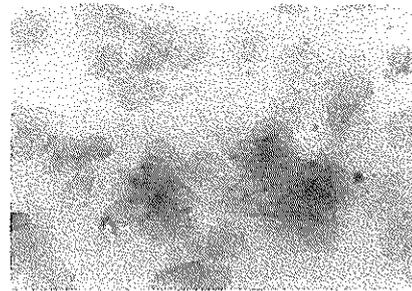
2.1.2. Pemeriksaan Preparat Ulas Vagina

Pemeriksaan preparat ulas vagina untuk menentukan fase siklus reproduksi dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran okuler 10x dan objektif 40x. Penentuan fase siklus reproduksi (proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus) dilakukan dengan mengamati ciri khas yang terdapat pada tiap siklus reproduksi seperti terlihat pada gambar 3.1.



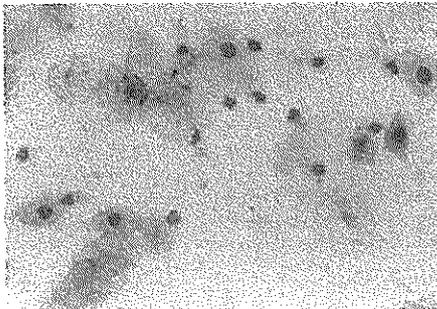
a. Proestrus

Terdapat sel berinti bulat



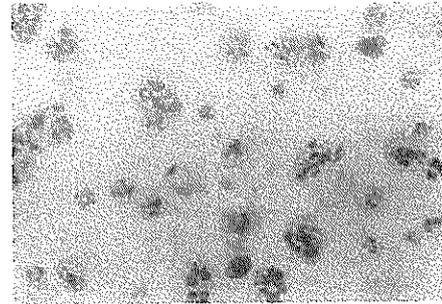
b. Estrus

Terdapat sel-sel yang mengalami pertandukan / kornifikasi



c. Metestrus

Terdapat sel-sel yang mengalami pertandukan dan mulai tampak adanya leukosit



d. Diestrus

Terdapat sel leukosit yang bertambah banyak dan mulai tampak adanya sel berinti bulat

Gambar 3.1. Fase Siklus Reproduksi

2.2 Pembuatan Preparat Ulas Darah

Pembuatan preparat ulas darah dilakukan dengan mengambil darah melalui vena coccygeae pada ekor. Vena coccigeae ditusuk dengan jarum yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian darah diulaskan diatas gelas objek. Setelah pembuatan preparat ulas darah, dilakukan fiksasi dengan menggunakan metanol selama 5 menit, dan diwarnai dengan pewarnaan Giemsa.

2.3. Pemeriksaan Preparat Ulas Darah.

Preparat ulas darah yang telah diberi minyak emersi diperiksa menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali (Objektif 100x, okuler 10x). Pada pemeriksaan tersebut lekosit dibedakan berdasarkan granula pada sitoplasma serta bentuk intinya. Penentuan lekosit mengacu pada ciri-ciri yang dinyatakan oleh Craigmyle (1986) yaitu:

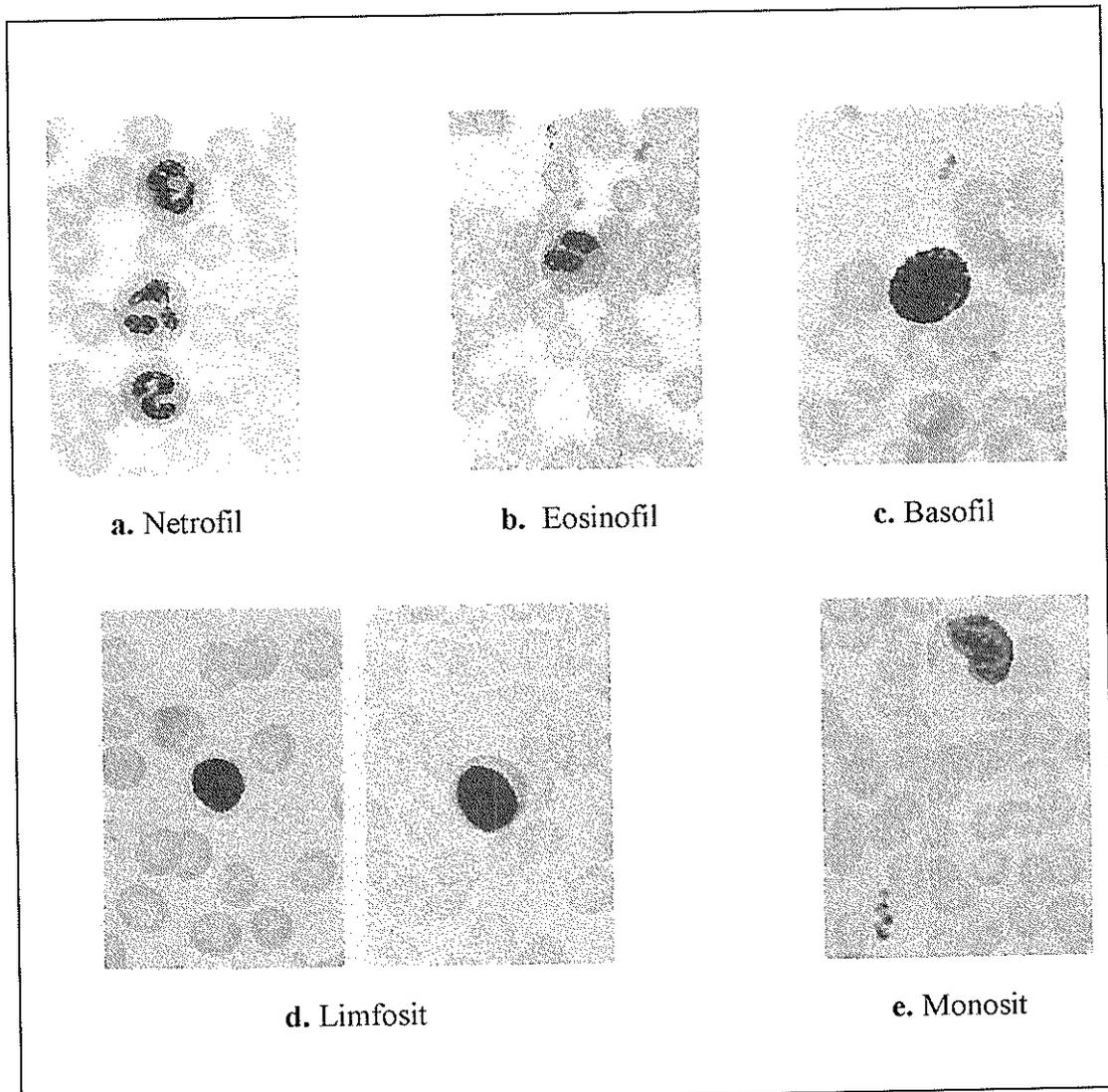
- a. bila pada sitoplasma didapatkan butir-butir granula halus berwarna biru dengan inti yang multilobi berbentuk seperti tapal kuda, batang atau pita, disebut netrofil (Gambar 3.2.a)
- b. bila pada sitoplasma didapatkan butir-butir granula merah muda yang besar-besar dengan inti bilobus, disebut eosinofil. (Gambar 3.2.b)
- c. bila pada sitoplasma didapatkan butir-butir granula basofil yang sangat besar sehingga menutupi intinya yang bilobus, disebut basofil. (Gambar 3.2.c)
- d. bila pada sitoplasma tidak terdapat butir granula dengan inti bulat dan besar mengisi hampir seluruh sel, disebut limfosit. (Gambar 3.2.d)

- e. bila sitoplasma berwarna lebih cerah (biru muda) dan tanpa butir-butir granula dengan inti berbentuk ginjal, disebut monosit (Gambar 3.2.e).

Penghitungan lekosit dilakukan sampai mencapai jumlah total 100, sehingga dalam penghitungan ini masing-masing jumlah sel darah putih dapat dinyatakan dalam satuan persen (%).

3. Analisis Data

Untuk menunjukkan perbedaan diantara rata-rata dari setiap fase siklus reproduksi, data yang didapat dianalisa secara statistik dengan metode ANOVA, Rancangan Acak Lengkap. Nilai probabiliti ($P < 0,05$) diterima sebagai hasil yang berbeda nyata.



Sumber : Craigmyle, 1986.

Gambar 3.2. Jenis-Jenis Lekosit

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

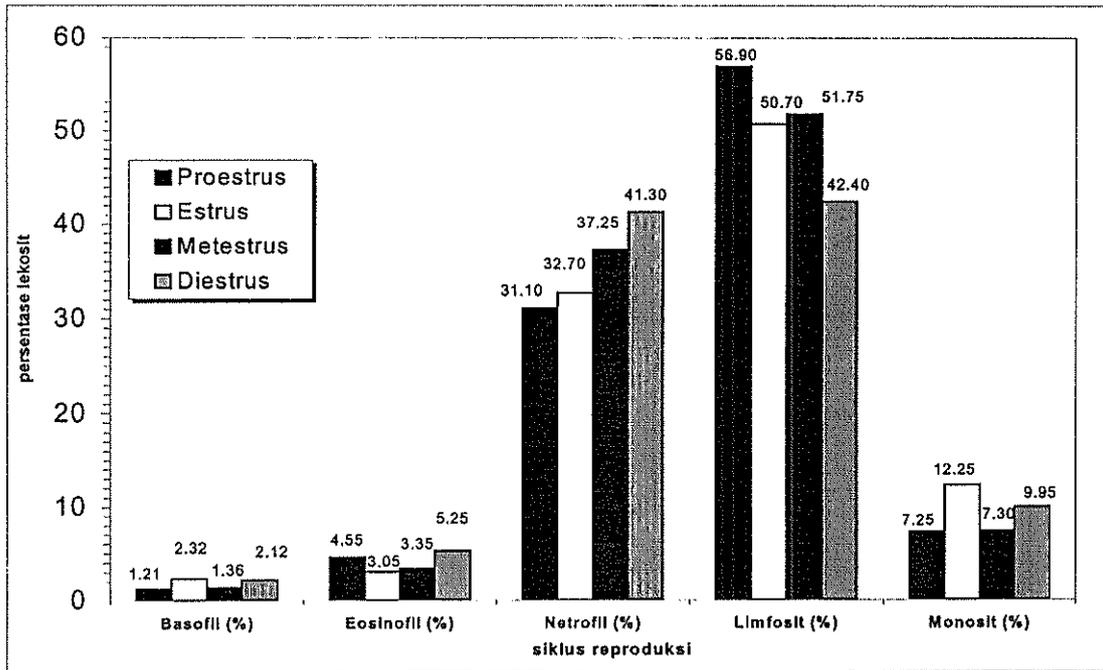
Rataan persentase jenis-jenis leukosit pada setiap siklus reproduksi tikus dapat dilihat pada tabel 4.1. dan gambar 4.1.

Tabel 4.1. Rataan Persentase Jenis-Jenis Leukosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp*)

Lekosit (%)	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Netrofil (%)	31,1	32,7	37,25	41,3
Eosinofil (%)	4,55	3,05	3,35	5,25
Basofil (%)	0,2	1,3	0,35	1,1
Limfosit (%)*	56,9	50,7	51,75	42,4
Monosit (%)*	7,25	12,25	7,3	9,95
Total (%)	100	100	100	100

*menunjukkan berbeda nyata pada taraf $P < 0,05$

Limfosit mempunyai persentase rata-rata yang tertinggi selama siklus reproduksi diikuti oleh netrofil, monosit, dan eosinofil. Persentase rata-rata basofil selama siklus reproduksi terlihat paling rendah dibanding jenis leukosit yang lainnya. Hal ini sesuai dengan hasil-hasil penelitian sebelumnya tentang komposisi jenis-jenis leukosit pada tikus, seperti yang dinyatakan juga oleh Ringler and Dabich (1979) serta Bloom and Fawcett (1975).



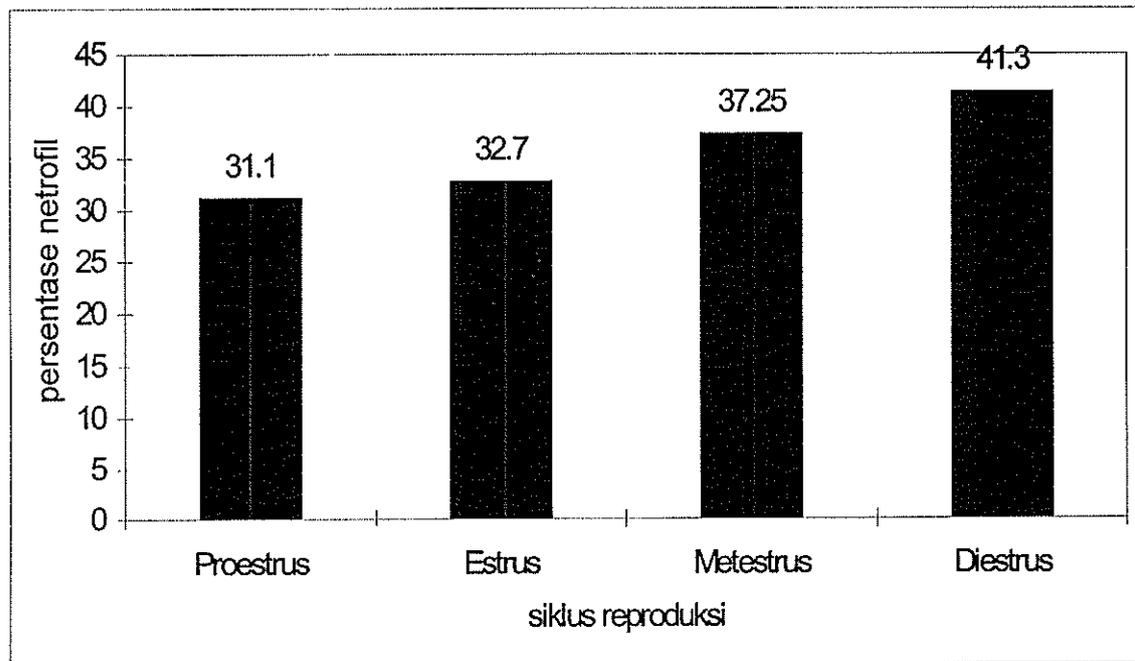
Gambar 4.1. Grafik Persentase Jenis-Jenis Leukosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*).

1. Netrofil

Persentase netrofil tiap fase siklus reproduksi tidak menunjukkan perbedaan nyata. Namun, persentase netrofil yang tinggi terlihat pada fase luteal, yaitu metestrus dan diestrus (Gambar 4.2.).

Selama fase luteal, terjadi peningkatan leukosit granulosit seiring dengan aktivitas fungsi korpus luteum (Gaytan *et al.*, 1998). Netrofil tinggi pada saat metestrus (Stzemienski *et al.*, 1984; Gaytan *et al.*, 1998), dan semakin meningkat selama diestrus karena adanya *LH receptor immunoreactivity* (LHRI) (Bukovsky *et al.*, 1995). Preparat ulas vagina juga menunjukkan hal yang sama, leukosit mulai nampak pada metestrus dan semakin meningkat selama diestrus. Sekresi

prostaglandin saat diestrus juga diduga meningkatkan faktor stimulir granulosit (Emond *et al.*, 1998), yang bersifat kemotaktik untuk netrofil.

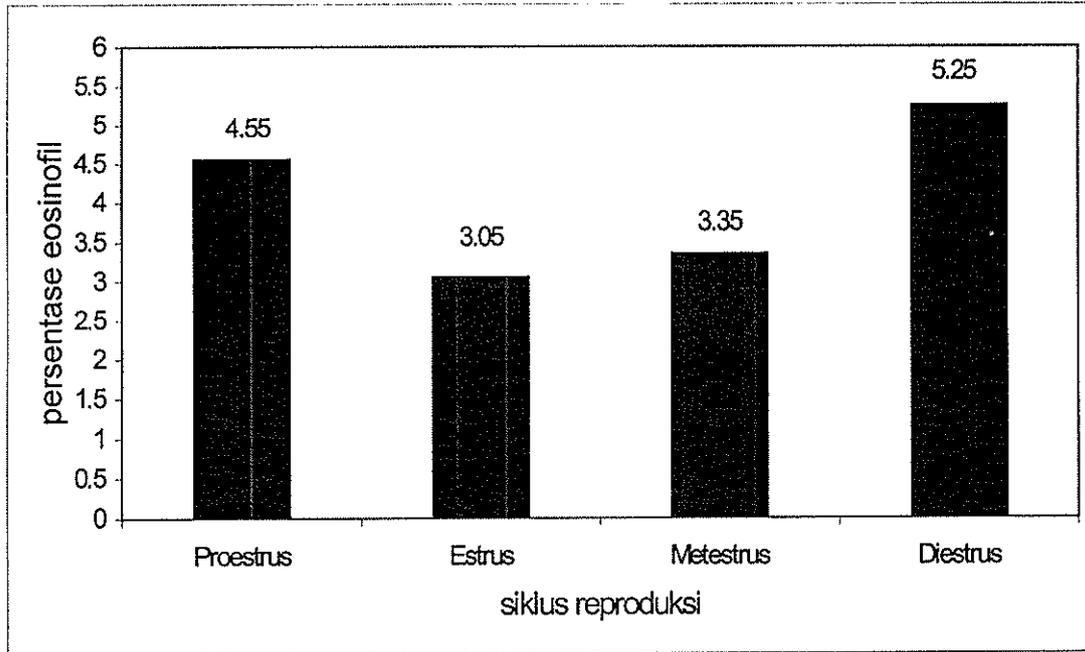


Gambar 4.2. Grafik Persentase Netrofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*)

Aktivitas myeloperoksidase meningkat selama fase folikuler, terutama saat estrus (Chun *et al.*, 1993; Stzemienski *et al.*, 1984). Hal ini dikuatkan oleh Cavender and Murdoch (1988) yang menyatakan peningkatan netrofil terjadi menjelang ovulasi. Netrofil selama estrus lebih tinggi dibanding proestrus dinyatakan oleh Brannstrom *et al.* (1993). *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang banyak terdapat di kelenjar sel epitel lumen diduga sebagai penyebab tingginya netrofil selama estrus.

2. Eosinofil

Persentase eosinofil dalam tiap fase siklus reproduksi tidak berbeda nyata. Persentase eosinofil yang tinggi terlihat pada saat proestrus dan pada diestrus (Gambar 4.3.)



Gambar 4.3. Grafik Persentase Eosinofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*)

Histamin yang terikat oleh granula basofil dikenal mempunyai kemampuan kemotaktik terhadap eosinofil. Cavender and Murdoch (1988), menyatakan bahwa sel basofil terakumulasi sepanjang proses luteinisasi, dan makin meningkat seiring perkembangan sel luteal. Persentase basofil yang lebih tinggi pada saat diestrus juga akan menarik lebih banyak eosinofil pada fase yang sama (Henson *et al.*, 1993).

Selama siklus reproduksi, distribusi eosinofil meningkat seiring dengan peningkatan estrogen (Leiva *et al.*, 1991). Pernyataan ini dikuatkan oleh Perez *et al.* (1996) bahwa secara tidak langsung estradiol meningkatkan distribusi eosinofil yang terstimulasi oleh *E2-dependent eosinophilic chemotactic factor* dalam uterus (ECF-U). Injeksi estradiol meningkatkan aktivitas peroxidase dan eosinofil dalam uterus juga dinyatakan oleh Terada *et al.*(1985). Persentase eosinofil yang tinggi terlihat dalam fase folikuler, yaitu proestrus dan estrus. Selama estrus, sekresi estrogen terlihat paling tinggi, yaitu beberapa saat menjelang ovulasi.

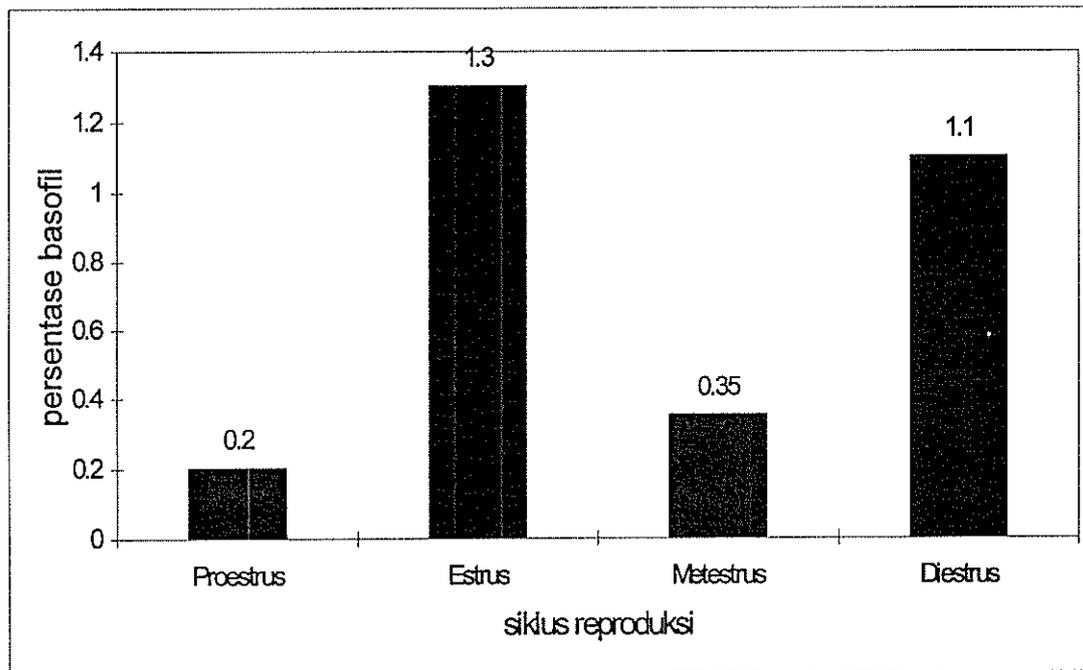
Persentase eosinofil saat proestrus lebih tinggi daripada saat estrus, walaupun tidak signifikan. Hasil ini didukung oleh Jeziorska *et al.* (1995) yang menyatakan selama siklus reproduksi, eosinofil terakumulasi sebelum dan sesudah menstruasi, atau saat diestrus dan proestrus pada siklus reproduksi. Gaytan *et al.* (1991) juga menyatakan eosinofil banyak terlihat selama proestrus. Persentase eosinofil yang rendah saat estrus diduga karena sistem pertahanan antibakterial saat estrus adalah dengan peningkatan sekresi mukus pada oleh endometrium dan serviks, serta dengan kornifikasi pada epitel vagina.

3. Basofil

Persentase basofil selama siklus reproduksi tidak mengalami perubahan yang berarti. Namun, persentase basofil yang tinggi tampak pada estrus dan diestrus (Gambar 4.4.).

Basofil identik dengan sel mast, yang oleh Jeziorska *et al.* (1995), dinyatakan bahwa basofil teridentifikasi di endometrium pada semua fase siklus

reproduksi. Pendapat ini mendukung pernyataan diatas bahwa persentase basofil tidak mengalami perubahan yang signifikan pada selama siklus reproduksi. Robertson *et al.* (1999) menyatakan bahwa terdapat perubahan distribusi leukosit pada tiap fase siklus reproduksi, tetapi secara umum ukuran dan distribusi populasi leukosit granulosit di organ reproduksi normal selama siklus reproduksi.



Gambar 4.4. Grafik Persentase Basofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*)

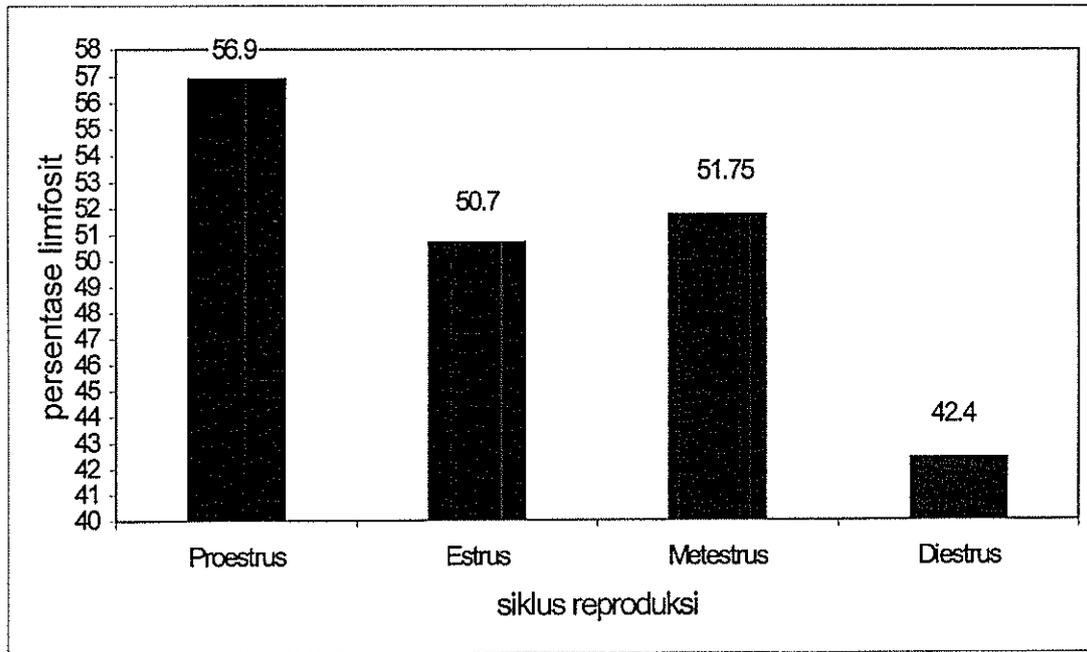
Selama estrus, epitel uterus menjadi matang, mukosa bertumbuh dengan cepat, dan terjadi kontraksi tuba falopii. Sekresi cairan bertambah, oedematous, serta ada peningkatan vaskularisasi (Toelihere, 1981). Hal ini selain disebabkan oleh estrogen, juga karena adanya sekresi histamin oleh basofil. Histamin terdapat dalam banyak jaringan dan terutama terlokalisasi dalam granula sel mast dan basofil (Henson *et al.*, 1993). Sekali dilepaskan, histamin dapat memaksakan beberapa

pengaruh farmakologiknya, termasuk kontraksi otot polos, kenaikan permeabilitas vaskuler, dan penambahan sekresi mukus. Aktivitas histamin yang nyata saat estrus tersebut menunjukkan persentase basofil tinggi selama estrus.

4. **Limfosit**

Persentase limfosit tampak berbeda nyata selama siklus reproduksi. Perbedaan yang nyata adalah antara diestrus dengan proestrus dan estrus. Persentase limfosit tertinggi nampak pada proestrus dan yang paling rendah selama diestrus (Gambar 4.5).

Progesteron yang tinggi selama diestrus diduga merupakan penyebab rendahnya limfosit selama diestrus. Limfosit, terutama T-limfosit dan sel NK, dapat menyebabkan kegagalan kebuntingan. Penghambatan aktivitas sel NK pada endometrium penting untuk keberhasilan kebuntingan, karena potensial aktivitas NK yang dapat menggagalkan konseptus (Liu and Hansen, 1993). Salah satu hormon yang dapat menghambat respon mediator T-limfosit yang terlibat dalam penolakan jaringan adalah progesteron (McDonald, 1980). Emond *et al.* (1998) juga menyatakan prostaglandin menghambat produksi *IL-1*, yang merupakan salah satu reseptor limfosit.

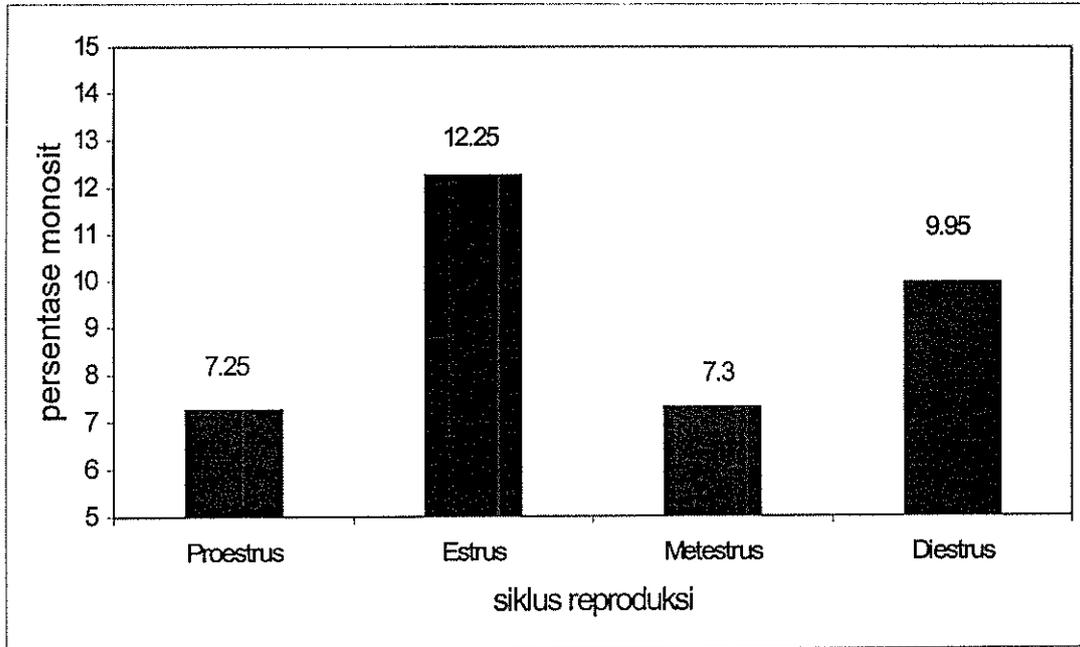


Gambar 4.5. Grafik Persentase Limfosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*)

Akumulasi makrofag terlihat tinggi selama diestrus. Interleukin berfungsi sebagai faktor pengaktif limfosit. Interleukin yang dihasilkan oleh makrofag selama diestrus, merangsang pendewasaan serta proliferasi sel limfosit (Herscowitz, 1993) sehingga terjadi aktivitas limfosit yang matang terjadi pada fase berikutnya, yaitu proestrus. Limfosit yang tinggi pada proestrus dinyatakan oleh Bukovsky *et al.* (1995) dan Jeziorska *et al.* (1995).

5. Monosit

Persentase monosit berbeda nyata pada tiap fase siklus reproduksi. Perbedaan nyata terjadi antara estrus dengan proestrus dan metestrus dimana persentase monosit paling tinggi selama estrus dan paling rendah pada proestrus (Gambar 4.6).



Gambar 4.6. Grafik Persentase Monosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih (*Rattus sp.*)

Secara umum, perubahan jumlah makrofag pada fase luteal seiring dengan aktivitas fungsional dari korpus luteum (Gaytan *et al.*, 1998). Uterus menghasilkan prostaglandin saat diestrus. Selain progesteron, prostaglandin juga meningkatkan faktor stimulasi makrofag (Emond *et al.*, 1998). Makrofag diduga memegang peranan dalam regresi korpus luteum (Bukovsky *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 1999). *MCP-1/monocyte chemoattractant protein-1* terstimulir ketika korpus luteum mulai

regresi (Penny *et al.*, 1998). *MCP-1* bersifat kemotaktik untuk monosit. Pada fase luteal, *MCP-1* ini menyebabkan persentase diestrus lebih tinggi daripada saat metestrus.

Bowen and Keyes (1999) menyatakan monosit terakumulasi saat estrus, lebih banyak dibanding fase sebelumnya, yaitu proestrus. Monosit yang tinggi saat estrus diduga distimulir oleh *MCP-1* yang meningkat selama estrus (Bowen and Keyes, 1999). Hal ini dikuatkan oleh Gaytan *et al.* (1998), bahwa dimulai dari proestrus monosit semakin meningkat sampai ovulasi (Brannstrom *et al.*, 1993).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Penelitian ini mengungkapkan bahwa pada *Rattus sp.* galur Spraque Dawley yang telah diadaptasikan pada lingkungan Indonesia maka didapatkan :

- a. persentase leukosit granulosit, yaitu basofil, eosinofil dan netrofil tidak mengalami perubahan yang nyata selama siklus birahi tikus putih (*Rattus sp.*).
- b. Perbedaan yang signifikan ditemukan pada persentase limfosit antara fase diestrus dengan proestrus dan estrus. Limfosit rendah selama diestrus, dibandingkan dengan fase proestrus atau estrus.
- c. Monosit juga menunjukkan perbedaan nyata antara estrus dengan proestrus dan metestrus. Monosit meningkat nyata saat estrus, dibandingkan fase proestrus atau metestrus.

2. Saran

Penelitian lebih lanjut tentang hormon-hormon atau peristiwa fisiologis selain siklus reproduksi yang secara nyata dapat mempengaruhi distribusi dan persentase leukosit secara fisiologis.

DAFTAR PUSTAKA

- Baker, D. E. J. 1979. Reproduction and Breeding. *In: Baker, H.J., J.R. Lindsey, and S.H. Weisbroth. (eds.): The Laboratory Rat. Academic Press Inc. pp154-157.*
- Bellanti, J.A. and J.V. Kadlec. 1993. Prinsip-Prinsip Immunologi. *Dalam: Wahab, S.A. (ed): Immunologi. Edisi 1. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. pp 1-17.*
- Bivin, W.S., M.P. Crawford, and N.R. Brewer. 1979. Morphophysiology. *In: Baker, H.J., J.R. Lindsey, and S.H. Weisbroth. (eds.): The Laboratory Rat. Academic Press Inc. pp 86-94.*
- Bloom, W. and D.W. Fawcett. 1975. A Textbook of Histology. W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp 141-157.
- Bowen, J.M. and P.L. Keyes. 1999. The Proestrous Prolactin Surge Is Not the Sole Initiator of Regressive Changes in Corpora Lutea of Normally Cycling Rats. *Biology of Reproduction* 61: 1208-1215.
- Bowen, J.M., R. Towns, J.S. Warren, and P. L. Keyes. 1999. Luteal Regression in the Normally Cycling Rat: Apoptosis, Monocyte Chemoattractant Protein-1, and Inflammatory Cell Involment. *Biology of Reproduction* 60: 740-746.
- Brannstrom, M., G. Mayrhofer, and S.A. Robertson. 1993. Localization of Leucocyte Subsets In Ovary During The Perioovulatory Period. *Biology of Reproduction* 48: 277-286.
- Bukovsky, A., M.R. Caudle, J.A. Keenan, J. Wimalasena, N.B. Upadhayaya, and S.E. Van Meter. 1995. Is Corpus Luteum Regression and Immune-Mediated Event? Localization of Immune System Components and Luteinizing Hormone Receptor In Human Corpora Lutea. *Biology of Reproduction* 53: 1373-1384.
- Cavender, J.L. and W.J. Murdoch. 1988. Morphological Studies of The Microcirculatory System of Perioovulatory Ovine Follicles. *Biology of Reproduction* 39: 989-997.
- Chun, S.Y., D. Daphna-Iken, D. Calman, and A. Tsafiriri. 1993. Severe Leukocyte Depletion Does Not Affect Follicular Rupture In The Rat. *Biology of Reproduction* 48: 905-909.
- Craigmyle, M.B.L. 1986. Atlas Berwarna Histologi. Edisi kedua. Terjemahan Jan Tambajong. EGC. 1987. pp 55.

- Dellman, H. and E.M. Brown. 1976. Textbook of Veterinary Histology. Lea and Febinger. Philadelphia.
- Donaldson, L. and W.M. Hansel. 1967. Histological Study of Bovine Corpora Lutea. *Journal Dairy Science* 48: 905.
- Emond, V., M.a. Fortier, B.D. Murphy, and R.D. Lambert. 1998. Prostaglandin E2 Regulated Both Interleukin-2 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene Expression In Bovine Lymphocytes. *Biology of Reproduction* 58: 143-151.
- Gaytan, F., C. Morales, L. Garcia-Pardo, C. Reymundo, C. Bellido, and J.E. Sanchez-Criado. 1998. Macrophages, Cell Proliferation, and Cell Death In the Human Menstrual Corpus Luteum. *Biology of Reproduction* 59: 417-425.
- Gaytan, F., J. Aceitero, C. Bellido, J.E. Sanchez-Criado, and E. Aguilar. 1991. Estrous Cycle-Related Changes In Mast Cell Numbers In Several Ovarian Compartment In The Rat. *Biology of Reproduction* 45: 27-33.
- Guyton, A.C. 1986. Textbook of Medical Physiology. Seventh edition. W.B. Saunders Co. 442 pp.
- Head, J.R., C.K. Kresge, J.D. Young, and J.C. Hiserodt. 1994. NKR-P1+cells In The Rat Uterus: Granulated Metriad Gland Cell Are of The Natural Killer Cell Lineage. *Biology of Reproduction* 51: 509-523.
- Henson, P.M., B.V.M., and S. 1993. Mekanisme Injuri Jaringan yang Dihasilkan Oleh Reaksi Immunologik. *Dalam Wahab, S.A. (ed): Immunologi. Edisi 1. Gajah Mada University Press. Yogyakarta pp 234-279.*
- Herscowitz, H.B. 1993. Immunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi. *Dalam Wahab, S.A. (ed): Immunologi. Edisi 1. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. pp 126-172.*
- Jeziorska, M., L.A. Salamonsen, and D.E. Woolley. 1995 Mast Cell and Eosinophil Distribution and Activation In Human Endometrium Throughout The Menstrual Cycle. *Biology of Reproduction* 53: 312-320.
- Jungueira, L.C. and J. Carneiro. 1980. Histologi Dasar. Edisi Ketiga. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kurniasih, D.S. 1999. Kadar Hormon Estrogen dan Progesteron Pada Setiap Fase Siklus Birahi Tikus Putih (*Rattus* sp). Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB.

- Leininger, J.R. and M.P. Jokinen. 1990. Oviduct, Uterus, and Vagina. *In* Boorman, G.A., S.L. Eustis, M.R. Elwell, C.A. Montgomery, and W.F. MacKenzie. (eds.): Pathology of the Fisher Rat. Academic Press Inc. pp 443.
- Leiva, M.C., Q. Xu, M. Galman, and C.R. Lyttle. 1991. Ontogeny of The Reproduction of An Estrogen-Regulated Eosinophil Chemotactic Factor In The Rat Uterus. *Biology of reproduction* 45: 818-823.
- Liu, W.J. and P.J. Hansen. 1993. Effect of Progesterone-Induced Serpin-Like Proteins of The Sheep Endometrium on Natural-Killer Cell Activity In Shepp and Mice. *Biology of Reproduction* 49: 1008-1014.
- Martini, F. 1992. Fundamentals of Anatomy and Physiology. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey.
- Mathur, C.E. and T.G. Kennedy. 1993. An investigation into the role of neutrophils in decidualization and early pregnancy in the rat. *Biology of Reproduction* 48: 1258-1265.
- McDonald, L.E. 1980. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Third edition. Lea and Febinger. Philadelphia. pp 274-329.
- Penny, L.A., D.G. Armstrong, G. Baxter, C. Hogg, H. Kindahl, T. Bramley, E.D. Watson, and R. Webb. 1998. Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Bovine Corpus Luteum Around the Time of Natural Luteolysis. *Biology of Reproduction* 59: 1464-1469.
- Perez, M.C., E.E. Furth, P.D. Matzumura, and C.R. Lyttle. 1996. Role of eosinophils in uterine responses to estrogen. *Biology of Reproduction* 54: 249-254.
- Raphael, S.S. 1987. Medical Laboratory Technology. Fourth Edition. W.B. Saunders Co. pp 615-675.
- Ringler, D.H. and L. Dabich. 1979. Hematology and Clinical Biochemistry. *In* Baker, H.J., J.R. Lindsey, and S.H. Weisbroth. (eds.): The Laboratory Rat. Academic Press Inc.
- Robertson, S.A., C.T. Roberts, K.L. Farr, A.R. Dunn, and R.F. Seamark. 1999. Fertility Impairment in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice. *Biology of Reproduction* 60: 251-261.
- Smith, B. and N. Soesanto Mangkoewidjojo. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Universitas Indonesia Press. Jakarta.

- Strzemienski, P.J., D. Do, and R.M. Kenney. 1984. Antibacterial Activity of Mare Uterine Fluid. *Biology of Reproduction* 31: 303-311.
- Terada, N., T. Yamane, K. Matsumoto, H. Asai, and Y. Kitamura. 1985. Estrogen-Induced Increased in Eosinophil Number and Peroxidase Activity In Uterus of Genetically Mast Cell-Deficient W/W^v Mice. *Biology of Reproduction* 33: 899-901.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi Keempat. Penerbit Angkasa. Bandung. 327 pp.
- Watts, J.R., P.J. Wright, C.S. Lee. 1978. Endometrial Cytology of the Normal Bitch Throughout the Reproductive Cycle. *J. Small Anim. Pract.* 39(I): 2-9.
- Wira, C.R. and D.A. Sullivan. 1985. Estradiol and Progesterone Regulation of Immunoglobulin A and G and Secretory Component in Cervicovaginal Secretions of the Rat. *Biology of Reproduction* 32: 90-95.

1. Penghitungan Netrofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih

Nomor	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	56	35	48	29
2	60	45	45	27
3	6	35	26	22
4	21	31	60	57
5	21	23	44	38
6	20	19	39	83
7	18	33	51	59
8	49	48	27	45
9	25	54	19	39
10	47	29	37	40
11	27	37	17	48
12	63	24	35	38
13	45	43	32	51
14	20	24	17	40
15	37	12	69	57
16	56	41	50	16
17	17	23	40	33
18	29	37	35	20
19	1	20	26	53
20	4	41	28	31
Mean	31,1	32,7	37,25	41,3
S.E.M.	4,30538	2,441	3,138785	3,577047
S.D.	19,2543	10,92	14,03707	15,99704
Variance	370,726	119,2	197,0395	255,9053
Coef. Var.	0,61911	0,334	0,376834	0,387338
Minimum	1	12	17	16
Maximum	63	54	69	83
Sum	622	654	745	826
N	20	20	20	20

Rancangan Acak Lengkap Analisa Sidik Ragam

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Mean	31,1	32,7	37,25	41,3
S.E.M.	4,305382189	2,4409877	3,1387854	3,57704671
S.D.	19,25425449	10,916429	14,037075	15,9970392
Variance	370,7263158	119,16842	197,03947	255,905263
Sum	622	654	745	826
N	20	20	20	20
Sum(x ²)	26388	23650	31495	38976
Sum ² /N	19344,2	21385,8	27751,25	34113,8
SS	7043,8	2264,2	3743,75	4862,2

Total Sum 2847
 Total N 80
 CF 101317,6125

ANOVA Table

Factor	SS	Df	Ms	F(cal)	P(F<=F(cal))	α F(0.05)
A (Between Groups)	1277,4375	3	425,8125	1,80651113	N.S. (P>0.05)	2,724944
R(A) (Within Groups)	17913,95	76	235,70987			
AR (Total)	19191,3875	79				

2. Penghitungan Eosinofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih

Tikus	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	0	1	4	1
2	1	1	0	0
3	5	1	3	2
4	9	1	6	5
5	2	2	4	5
6	8	3	5	2
7	6	4	3	1
8	9	0	2	5
9	1	1	5	21
10	2	6	5	1
11	2	5	4	10
12	4	10	8	8
13	16	7	7	26
14	3	0	0	1
15	2	4	5	1
16	2	0	0	0
17	12	5	1	2
18	2	3	0	6
19	2	4	5	3
20	3	3	0	5
Mean	4,55	3,05	3,35	5,25
S.E.M.	0,94165	0,591	0,563238	1,531898
S.D.	4,2112	2,645	2,518876	6,850855
Variance	17,7342	6,997	6,344737	46,93421
Coef. Var.	0,92554	0,867	0,751903	1,304925
Minimum	0	0	0	0
Maximum	16	10	8	26
Sum	91	61	67	105
N	20	20	20	20

Rancangan Acak Lengkap Analisa Sidik Ragam

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Mean	4,55	3,05	3,35	5,25
S.E.M.	0,941653082	0,5914968	0,5632378	1,53189769
S.D.	4,211200604	2,6452539	2,5188761	6,85085473
Variance	17,73421053	6,9973684	6,3447368	46,9342105
Sum	91	61	67	105
N	20	20	20	20
Sum(x ²)	751	319	345	1443
Sum ² /N	414,05	186,05	224,45	551,25
SS	336,95	132,95	120,55	891,75

Total Sum 324
 Total N 80
 CF 1312,2

ANOVA Table

Factor	SS	Df	Ms	F(cal)	P(F<=F(cal))	F(0.05)
A (Between Groups)	63,6	3	21,2	1,08703279	N.S. (P>0.05)	2,724944
R(A) (Within Groups)	1482,2	76	19,502632			
AR (Total)	1545,8	79				

3. Penghitungan Basofil Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih

Tikus	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	0	2	0	8
2	0	6	0	0
3	2	0	0	3
4	0	1	0	0
5	2	0	2	1
6	0	6	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	4
9	0	0	0	1
10	0	5	1	1
11	0	1	0	2
12	0	0	2	1
13	0	5	1	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	1	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	1
20	0	0	0	0
Mean	0,2	1,3	0,35	1,1
S.E.M.	0,13765	0,498	0,15	0,440693
S.D.	0,61559	2,227	0,67082	1,97084
Variance	0,37895	4,958	0,45	3,884211
Coef. Var.	3,07794	1,713	1,91663	1,791673
Minimum	0	0	0	0
Maximum	2	6	2	8
Sum	4	26	7	22
N	20	20	20	20

Rancangan Acak Lengkap Analisa Sidik Ragam

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Mean	0,2	1,3	0,35	1,1
S.E.M.	0,13764944	0,4978903	0,15	0,44069323
S.D.	0,615587011	2,226633	0,6708204	1,97084006
Variance	0,378947368	4,9578947	0,45	3,88421053
Sum	4	26	7	22
N	20	20	20	20
Sum(x ²)	8	128	11	98
Sum ² /N	0,8	33,8	2,45	24,2
SS	7,2	94,2	8,55	73,8
Total Sum	59			
Total N	80			
CF	43,5125			

ANOVA Table

Factor	SS	Df	Ms	F(cal)	P(F<=F(cal))	F(0.05)
A (Between Groups)	17,7375	3	5,9125	2,44544218	N.S. (P>0.05)	2,724944
R(A) (Within Groups)	183,75	76	2,4177632			
AR (Total)	201,4875	79				

4. Penghitungan Limfosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih

Nomor	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	36	59	37	59
2	37	31	42	58
3	79	52	60	61
4	64	63	28	26
5	68	46	50	48
6	59	58	51	15
7	61	52	42	30
8	39	47	66	42
9	69	43	73	23
10	43	48	55	47
11	62	48	78	31
12	29	52	51	47
13	36	38	36	23
14	70	61	75	45
15	52	64	23	40
16	39	54	45	64
17	57	55	53	51
18	57	51	53	66
19	93	48	56	27
20	88	44	61	45
Mean	56,9	50,7	51,75	42,4
S.E.M.	4,04052	1,851	3,310967	3,382929
S.D.	18,0697	8,279	14,80709	15,12892
Variance	326,516	68,54	219,25	228,8842
Coef. Var.	0,31757	0,163	0,286127	0,356814
Minimum	29	31	23	15
Maximum	93	64	78	66
Sum	1138	1014	1035	848
N	20	20	20	20

Rancangan Acak Lengkap Analisa Sidik Ragam

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Mean	56,9	50,7	51,75	42,4
S.E.M.	4,040518466	1,8511732	3,3109666	3,38292928
S.D.	18,06974791	8,2786981	14,807093	15,1289197
Variance	326,5157895	68,536842	219,25	228,884211
Sum	1138	1014	1035	848
N	20	20	20	20
Sum(x ²)	70956	52712	57727	40304
Sum ² /N	64752,2	51409,8	53561,25	35955,2
SS	6203,8	1302,2	4165,75	4348,8

Total Sum 4035
 Total N 80
 CF 203515,3125

ANOVA Table

Factor	SS	Df	Ms	F(cal)	P(F<=F(cal))	F(0.05)
A (Between Groups)	2163,1375	3	721,04583	3,42057441 *	0,021414064	2,724944
R(A) (Within Groups)	16020,55	76	210,79671			
AR (Total)	18183,6875	79				

Lampiran 4

Uji Lanjutan dengan T-Test

	Proestrus	Estrus
Mean	56,9	50,7
S.E.M.	4,0405185	1,851173
		2
S.D.	18,069748	8,278698
		1
Variance	326,51579	68,53684
		2
Sum	1138	1014
N	20	20
Sum(x ²)	70956	52712
Sum(x) ² /N	64752,2	51409,8
Correction Factor	115777,6	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	370,37895	
t(cal)	1,4407331	N.S. (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,1659372	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-6,537887	
Upper Conf. Limit of Difference	18,937887	

	Proestrus	Metestrus
Mean	56,9	51,75
S.E.M.	4,040518	3,31096663
		5
S.D.	18,06974	14,8070929
		8
Variance	326,5157	219,25
		9
Sum	1138	1035
N	20	20
Sum(x ²)	70956	57727
Sum(x) ² /N	64752,2	53561,25
Correction Factor	118048,2	
		3
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	345,3973	
t(cal)	1,239260	N.S. 8 (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,230339	
t(0.05) Two-sided	2,093024	3
		1
Lower Conf. Limit of Difference	-7,150811	
Upper Conf. Limit of Difference	17,45081	1

Lampiran 4

	Proestrus	Diestrus
Mean	56,9	42,4
S.E.M.	4,0405185	3,382929
		3
S.D.	18,069748	15,12892
Variance	326,51579	228,8842
		1
Sum	1138	848
N	20	20
Sum(x ²)	70956	40304
Sum(x) ² /N	64752,2	35955,2
Correction Factor	98604,9	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	691,63158	
t(cal)	2,4657304 * (P<=0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,0233654	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-2,906507	
Upper Conf. Limit of Difference	31,906507	

	Estrus	Metestrus
Mean	50,7	51,75
S.E.M.	1,851173	3,31096663
		2
S.D.	8,278698	14,8070929
		1
Variance	68,53684	219,25
		2
Sum	1014	1035
N	20	20
Sum(x ²)	52712	57727
Sum(x) ² /N	51409,8	53561,25
Correction Factor	104960,0	
		3
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	345,8394	
Difference	7	
t(cal)	-0,252503	N.S. (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,803363	
	6	
t(0.05) Two-sided	2,093024	
	1	
Lower Conf. Limit of Difference	-11,25868	
Upper Conf. Limit of Difference	13,35868	
	1	

Lampiran 4

	Estrus	Diestrus
Mean	50,7	42,4
S.E.M.	1,8511732	3,3829293
S.D.	8,2786981	15,128923
Variance	68,536842	228,88421
Sum	1014	848
N	20	20
Sum(x ²)	52712	40304
Sum(x) ² /N	51409,8	35955,2
Correction Factor	86676,1	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	300,95789	
t(cal)	2,1396376 * (P<=0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,045578	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-3,182253	
Upper Conf. Limit of Difference	19,782253	

	Metestrus	Diestrus
Mean	51,75	42,4
S.E.M.	3,3109666	3,38292928
S.D.	14,807096	15,12891973
Variance	219,25	228,884211
Sum	1035	848
N	20	20
Sum(x ²)	57727	40304
Sum(x) ² /N	53561,25	35955,2
Correction Factor	88642,22	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	462,8710	
t(cal)	1,943553	N.S. 9 (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,066912	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-4,889811	
Upper Conf. Limit of Difference	23,589811	

5. Penghitungan Monosit Pada Tiap Fase Siklus Reproduksi Tikus Putih

Nomor	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	8	3	11	3
2	2	17	13	15
3	8	12	11	12
4	6	4	6	12
5	7	29	0	8
6	13	14	5	0
7	15	11	4	10
8	3	5	5	4
9	5	2	3	16
10	8	12	2	11
11	9	9	1	9
12	4	14	4	6
13	3	7	24	0
14	7	15	8	14
15	9	20	3	2
16	3	5	5	20
17	14	17	5	14
18	12	9	12	8
19	4	28	13	16
20	5	12	11	19
Mean	7,25	12,25	7,3	9,95
S.E.M.	0,86412	1,672	1,267197	1,35039
S.D.	3,86448	7,475	5,667079	6,039127
Variance	14,9342	55,88	32,11579	36,47105
Coef. Var.	0,53303	0,61	0,776312	0,606947
Minimum	2	2	0	0
Maximum	15	29	24	20
Sum	145	245	146	199
N	20	20	20	20

Rancangan Acak Lengkap Analisa Sidik Ragam

	Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Mean	7,25	12,25	7,3	9,95
S.E.M.	0,864124138	1,6715499	1,2671975	1,35038981
S.D.	3,864480628	7,4753982	5,6670794	6,03912681
Variance	14,93421053	55,881579	32,115789	36,4710526
Sum	145	245	146	199
N	20	20	20	20
Sum(x ²)	1335	4063	1676	2673
Sum ² /N	1051,25	3001,25	1065,8	1980,05
SS	283,75	1061,75	610,2	692,95

Total Sum 735
 Total N 80
 CF 6752,8125

ANOVA Table

Factor	SS	Df	Ms	F(cal)	P(F<=F(cal))	F(0.05)
A (Between Groups)	345,5375	3	115,17917	3,30493522*	0,024646349	2,724944
R(A) (Within Groups)	2648,65	76	34,850658			
AR (Total)	2994,1875	79				

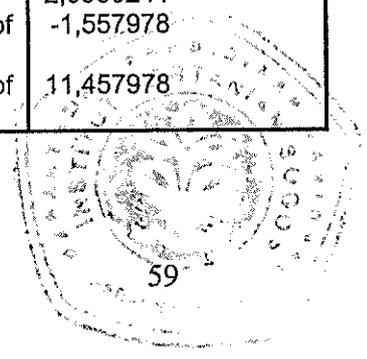
Uji Lanjutan dengan T-Test

	Proestrus	Estrus
Mean	7,25	12,25
S.E.M.	0,8641241	1,67155
S.D.	3,8644806	7,4754
Variance	14,934211	55,8816
Sum	145	245
N	20	20
Sum(x ²)	1335	4063
Sum(x) ² /N	1051,25	3001,25
Correction Factor	3802,5	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	65,684211	
t(cal)	-2,759018 * (P<=0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,0124883	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-0,364197	
Upper Conf. Limit of Difference	10,364197	

	Proestrus	Metestrus
Mean	7,25	7,3
S.E.M.	0,8641241	1,26719749
S.D.	3,8644806	5,66707945
Variance	14,934211	32,1157895
Sum	145	146
N	20	20
Sum(x ²)	1335	1676
Sum(x) ² /N	1051,25	1065,8
Correction Factor	2117,025	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	61,102632	
t(cal)	-0,028606 N.S. (P>0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,9774773	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-5,123735	
Upper Conf. Limit of Difference	5,2237351	

	Proestrus	Diestrus
Mean	7,25	9,95
S.E.M.	0,8641241	1,35039
S.D.	3,8644806	6,03913
Variance	14,934211	36,4711
Sum	145	199
N	20	20
Sum(x ²)	1335	2673
Sum(x) ² /N	1051,25	1980,05
Correction Factor	2958,4	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	62,221053	
t(cal)	-1,530771 N.S. (P>0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,1423064	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-2,52087	
Upper Conf. Limit of Difference	7,9208703	

	Estrus	Metestrus
Mean	12,25	7,3
S.E.M.	1,6715499	1,26719749
S.D.	7,4753982	5,66707945
Variance	55,881579	32,1157895
Sum	245	146
N	20	20
Sum(x ²)	4063	1676
Sum(x) ² /N	3001,25	1065,8
Correction Factor	3822,025	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	96,681579	
t(cal)	2,2513775 * (P<=0.05) Two-sided	
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,0363913	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-1,557978	
Upper Conf. Limit of Difference	11,457978	



Lampiran 5

	Estrus	Diestrus
Mean	12,25	9,95
S.E.M.	1,6715499	1,35039
S.D.	7,4753982	6,03913
Variance	55,881579	36,4711
Sum	245	199
N	20	20
Sum(x ²)	4063	2673
Sum(x) ² /N	3001,25	1980,05
Correction Factor	4928,4	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	87,589474	
t(cal)	1,0990485	N.S. (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,2854788	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-3,894413	
Upper Conf. Limit of Difference	8,4944134	

	Metestrus	Diestrus
Mean	7,3	9,95
S.E.M.	1,2671975	1,35038981
S.D.	5,6670794	6,03912681
Variance	32,115789	36,4710526
Sum	146	199
N	20	20
Sum(x ²)	1676	2673
Sum(x) ² /N	1065,8	1980,05
Correction Factor	2975,625	
Df	19	
Expected Difference	0	
Variance of Difference	74,555263	
t(cal)	-1,37253	N.S. (P>0.05) Two-sided
P(t<=t(cal)) Two-sided	0,1858848	
t(0.05) Two-sided	2,0930241	
Lower Conf. Limit of Difference	-3,064962	
Upper Conf. Limit of Difference	8,3649625	