

1. PLANTS, MEDICINAL

2. SPERMATOZOA

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

KRB

KK-2B

G15.321

Bam

P



LAPORAN PENELITIAN  
ILMU PENGETAHUAN DASAR  
TAHUN ANGGARAN 2002

## PENGARUH FRAKSI POLIFENOL *Gendarussa vulgaris* Nees PADA PENURUNAN AKTIVITAS HIALURONI-DASE SPERMATOZOA MENCIT MELALUI UJI FERTILITAS IN VITRO

Oleh:

Drs. BAMBANG PRAJOGO E.W., MS., Apt.

Drh. WIDJIATI, MS.

Drs. MULYADI TANJUNG, MS.



\*016403141\*

3000164033141

### LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh Bagian Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi

DIP Nomor : 019/XXIII/1--/2002 Tanggal 1 Januari 2002

Kontrak Nomor : 024/P2IPT/DPPM/IV/2002

Dirbinlitabmas Dirjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 5

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA



September, 2002



# UNIVERSITAS AIRLANGGA LEMBAGA PENELITIAN

- |  |                                       |  |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional         | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional             | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      |  |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga                   | 10. Puslit Kesehatan Reproduksi                  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5996718)   | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066  
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

3000164033141

## IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN ILMU PENGETAHUAN DASAR

1. a. Judul Penelitian	: PENGARUH FRAKSI POLIFENOL Gendarussa vul garis Ness PADA PENURUNAN AKTIVITAS HIA
b. Macam Penelitian	: LIRONIDASE SPERMATOZOA MENCIT MELALUI UJI FERTILISASI INVITRO
2. Kepala Poyek Penelitian	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Dr. Bambang Prajogo E.W., MS.
b. Jenis kelamin	: Laki-laki
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata Tk.I / Gol. IIID
d. Jabatan Sekarang	: Lektor
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Farmasi
f. Univ/Inst./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Farmakognosi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 Orang
4. Lokasi Penelitian	: Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 6 Bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp 10.000.000,- ( Sepuluh juta rupiah )

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

Surabaya, 19 Nopember 2002

Ketua Peneliti

Dr. Bambang Prajogo-E.W., MS.

NIP 131 470 993

Mengetahui :  
Dekan Fak./Puslit.

Dr. Noor Cholies Z.

NIP 130 355 372

Menyetujui :  
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.  
NIP 130 701 125

## RINGKASAN

**JUDUL PENELITIAN : PENGARUH FRAKSI POLIFENOL *Gendarussa vulgaris* Nees  
PADA PENURUNAN AKTIVITAS HIALORONIDASE  
SPERMATOZOA MENCIT MELALUI UJI FERTILISASI *IN  
VITRO***

**KETUA PENELITIAN : Dr. BAMBANG PRAJOGO, E.W., MS., Apt.**

**ANGGOTA PENELITIAN : WIDJIATI, MSi., Drh.  
MULYADI TANJUNG, MS., Drs.**

**TAHUN : OKTOBER 2002, 35 halaman**

Gandarusa ( *Gendarussa vulgaris* Nees ) adalah salah satu tanaman yang digunakan sebagai bahan kontrasepsi pria masyarakat Sentani, Irian Jaya. Penggunaannya sendiri hanya didasarkan pada pengalaman atau pengetahuan yang diwariskan secara turun temurun. Untuk dapat memperoleh informasi yang jelas mengenai efek kontrasepsi bagi pria maka dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak polifenol terhadap penurunan fungsi penetrasi spermatozoa pada ovum mencit (*Mus musculus*) dengan metode fertilisasi *in vitro* (IVF). Penelitian ini diharapkan dapat menambah data ilmiah tentang tanaman ini, sekaligus sebagai langkah awal yang membuka kemungkinan untuk pengembangan lebih lanjut. Dalam penelitian ini digunakan 3 kelompok mencit jantan fertil sebagai hewan uji yang masing-masing terdiri dari 10 ekor mencit. Kelompok I (G1), yaitu kelompok hewan coba yang diberi ekstrak 15mg/20g bb. Kelompok II (GII), yaitu kelompok hewan yang diberi ekstrak 30mg/20g bb. Sedangkan kelompok kontrol hanya diberi air suling biasa. Penelitian yang dilakukan ini merupakan rangkaian dari penelitian sebelumnya yang menekankan pada efek hambatan enzim spermatozoa dalam mendispersikan kumulus oophorus. Ekstrak diberikan secara

per-oral sekali sehari dan lama pemberiannya disesuaikan dengan 1,5 kali siklus spermatogenesis mencit yaitu selama 55 hari. Pada hari yang telah ditentukan mencit jantan dibedah, spermanya diambil dengan memotong bagian cauda epididimisnya. Selanjutnya dilakukan proses fertilisasi *in vitro* dan inkubasi selama 7 jam.

Pengamatan dilakukan dengan penghitungan terhadap jumlah sel granulosa, serta diamati pula adanya sel telur yang terfertilisasi dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Data yang diperoleh diuji dengan menggunakan anova.

Dari hasil pengamatan terlihat bahwa dari kelompok perlakuan tidak terjadi fertilisasi setelah 7 jam inkubasi. Hal ini dapat dilihat dari sel granulosanya yang tetap intact (utuh) dan tidak terbentuknya zigot. Sedangkan dari kelompok kontrol terlihat adanya fertilisasi dan hal ini ditandai dengan sel granulosanya yang sudah tidak intact lagi, adanya kepala serta ekor spermatozoa pada inti sel telur, sudah terbentuknya pronukleus jantan dan betina serta telah terbentuknya zigot. Dan dari hasil anova terhadap parameter yang diukur yaitu jumlah sel granulosa, terlihat ada perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan derajat kepercayaan 95% ( $P < 0,05$ ).

(Fakultas Farmasi Universitas Airlangga : No. SK Ketua Lemlit Unair No. 474/JO3/PG/2002, No. Kontrak 024/P2IPT/DPPM/IV/2002)

## SUMMARY

RESEARCH TITLE : EFFECT OF POLYPHENOL FRACTION OF *Gendarussa vulgaris* Nees. ON DECREASE OF HYALURONIDASE MICE SPERMATOZOA ACTIVITY BY *IN VITRO* FERTILIZATION

RESEARCHER : Bambang Prajogo E.W., Widjiati and Muljadi Tandjung

---

*Gendarussa vulgaris* Nees (Acanthaceae) is one of male contraceptive used at Sentani, Papua Province. Reason of the using based on empirical and ethnical knowledge. To know the mechanism of action, research on effect of polyphenol fraction of *G.vulgaris* on the decrease of mice spermatozoa function on mice oocyt by *in vitro* fertilization was done. It is hoped this research could added scientific data especially of that plant, also to improve the use as medicinal plant. In this research 3 groups of fertile male mice contains 10 mice per groups was used. The doses were 15 mg/20 g.bw and 30 mg/20 g.bw polyphenol fraction once a day for 55 days (1,5 times spermatogenic cycles) beside normal control.

All of the experimental animals were killed by dislocation on the end of treatment, further more spermatozoa was taken from cauda epididymal organ. *In vitro* fertilitation was processed after 7 hours incubation.

Identification by counting granulose cell and oocyt fertilized through *in vitro* fertilization process and then statistical examination by variance analysis.

Result shown that with doses of polyphenol fraction could inhibition mice spermatozoa penetration IVF shown by no zygote developed. Further more also could be identified that no dispersion of cumulus oophorus or granulose cell significantly ( $p < 0,05$ ).

(Fakultas Farmasi Universitas Airlangga : No. SK Ketua Lemlit Unair No. 474/JO3/PG/2002, No. Kontrak 024/P2IPT/DPPM/IV

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kegiatan penelitian dengan judul “**PENGARUH FRAKSI POLIFENOL *Gendarussa vulgaris* Nees PADA PENURUNAN AKTIVITAS HIALORONIDASE SPERMATOZOA MENCIT MELALUI UJI FERTILISASI *IN VITRO***” dapat kami selesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat dilaksanakan atas pembiayaan dari dana Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Tahun Anggaran 2002. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi, selaku pemberi dana.
2. Prof. Dr. dr. Med. Puruhito, selaku Rektor Universitas Airlangga.
3. Prof. Dr. Sarmanu MS., drh., selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
4. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Drs. IGP. Santa, selaku Kepala Laboratorium Botani Farmakognosi.
6. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Akhirnya, diharapkan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan penelitian khususnya di bidang antifertilitas pria.

Surabaya, Oktober 2002

**Tim Peneliti**

## DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Hipotesa.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Tinjauan tentang Tanaman <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees.....	5
2.1.1. Klasifikasi Tanaman.....	5
2.1.2. Nama Daerah Tanaman.....	5
2.1.3. Morfologi dan Ekologi.....	6
2.1.4. Kandungan Kimia Tanaman.....	6
2.1.5. Kegunaan Tanaman.....	7
2.2. Tinjauan Tentang Senyawa Flavonoid.....	7
2.3. Tinjauan Tentang Sperma.....	8
2.3.1. Spermatozoa.....	9

2.3.2.	Plasma Sperma .....	11
2.4.	Tinjauan Tentang Spermatogenesis .....	12
2.5.	Tinjauan Tentang Epididimis .....	13
2.6.	Tinjauan Tentang Ovum .....	14
2.7.	Tinjauan Tentang Fertilisasi .....	14
2.8.	Tinjauan Tentang Mencit .....	16
<b>BAB III</b>	<b>MATERI DAN METODE PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
3.1.	Bahan Penelitian .....	17
3.1.1.	Bahan untuk pembuatan ekstrak .....	17
3.1.2.	Bahan pelarut .....	17
3.1.3.	Hewan coba .....	17
3.2	Alat-alat Penelitian .....	18
3.3.	Variabel Penelitian .....	18
3.4.	Metode Penelitian .....	18
3.4.1.	Pembuatan Ekstrak .....	18
3.4.2.	Uji Fertilitas Mencit Jantan .....	19
3.4.3.	Pengambilan Sampel Hewan Coba .....	19
3.4.4.	Tahapan Proses Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	19
3.5.	Pengolahan Data .....	22
<b>BAB IV</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>24</b>
4.1.	Hasil Ekstraksi Daun Gandarusa .....	24
4.2.	Data Hasil Uji Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	25
<b>BAB V</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>



BAB VI KESIMPULAN .....	31
6.1. Kesimpulan .....	31
6.2. Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA .....	32
LAMPIRAN.....	36

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun gandarusa.....	24
Tabel 2. Data hasil uji fertilisasi <i>in vitro</i> .....	25
Tabel 3. Data pengamatan sel granulosa.....	25

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema ekstraksi daun gandarussa .....	23
Gambar 2. Diagram batang rata-rata jumlah sel granulosa.....	26
Gambar 3. Sel spermatozoa mencit (400 X).....	26
Gambar 4. Sel telur mencit (400 X).....	26
Gambar 5. Proses fertilisasi in vitro (100X).....	27
Gambar 6. Zigot mencit(400 X).....	27
Gambar 7. Perkembangan Embrio mencit.....	27
Gambar 8. Perkembangan Embrio mencit .....	27

# BAB I

## PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang Masalah

Dewasa ini usaha Keluarga Berencana ( KB ) terutama di Indonesia ditujukan pada pihak wanita saja. Pihak pria merupakan bagian program KB yang terlupakan. Peranan pria dalam KB sangat penting karena biasanya pihak suami sangat dominan dalam menentukan kebijaksanaan keluarga. Oleh karena itu, tepat apabila dalam masalah KB ini pihak suami juga diikutsertakan (Man and Lutwark Mann, 1981). Salah satu usaha untuk meningkatkan peran pria dalam program KB dengan jalan mencari metode kontrasepsi pria yang dapat diterima dan memenuhi syarat kontrasepsi yang ideal (Zanaveld, 1976).

Dalam proses reproduksi sperma menetapkan salah satu bagian yang penting untuk menilai tingkat kesuburan. Adapun yang menentukan potensi membuahi adalah motilitas spermatozoa dan kemampuan membuahi dimana hal ini berhubungan dengan persiapan kapasitas spermatozoa.

Berdasarkan letak kerjanya, kontrasepsi pria dapat bekerja pertama di pretestikuler, dengan menghambat proses pembuatan spermatozoa melalui hambatan terhadap hormon yang mempengaruhi testis, contohnya hormon yang berasal kelenjar pituitary anterior. Kedua di testikuler yang bekerja pada testis dengan menghambat pembentukan sperma dan hormon-hormon seksual seperti testosteron. Ketiga post testikuler yang bekerja pada organ setelah testis, contohnya di vas deferens dengan vasektomi (Farnsworth and Waller, 1982). Vasektomi

menurut beberapa ahli dalam program KB kurang ideal karena sifatnya yang tidak reversibel (Zanaveld, 1976). Untuk itu diusahakan cara kontrasepsi yang bersifat reversibel, dapat nrengambat produksi spermatozoa sampai pada spermatozoa yang infertil, tidak menghambat potensi seksual dan perilaku, dan tidak ada efek samping terhadap sistem kardiovaskular, fungsi hati, ginjal dan sebagainya yang menjadi syarat metode KB yang ideal (Farnsworth and Waller, 1982).

Fungsi spermatozoa meliputi kapasitas, migrasi, binding, penetrasi dan fusi. Dalam hal binding berhubungan dengan kemampuan spermatozoa dalam melakukan penetrasi pada sel telur. Hal ini terjadi karena tetap aktifnya enzim yang terdapat pada akrosom yang bekerja spesifik dan berurutan pada beberapa lapisan sel telur (Li *et al.*, 1997) Khusus pada fungsi binding dan penetrasi terdapat enzim spesifik spermatozoa antara lain hialuronidase, Enzim Penetrasi Corona ( CPE ) dan akrosin. Hialuronidase berfungsi untuk penetrasi pada cumulus oophorus, CPE penetrasi pada corona radiata dan akrosin penetrasi pada daerah zona pelucida. Enzim tersebut sifatnya individual, spesifik dan harus berurutan, jadi apabila enzim hialuronidase telah bekerja menghidrolisa cumulus oophorus, maka enzim berikutnya akan disekresi. Sebaliknya bila daya kerja enzim hialuronidase dihambat tentunya akan menurunkan kemampuan mendispersi cumulus oophorus yang pada akhirnya tidak terjadi penetrasi dan ini merupakan sifat kerja inhibitor enzim hialuronidase. Hal inilah yang dijadikan dasar pengembangan kontrasepsi pria saat ini dan masa depan, yang lebih menekankan pada mekanisme gangguan penetrasi (Moeso dan Agus, 1985).

S. Moesa dan Agus P (Hegnauer, 1973) melaporkan bahwa daun *Gendarussa vulgaris* Nees telah digunakan oleh sebagian masyarakat di Irian Jaya sebagai obat kontrasepsi pria. Berdasarkan penelitian mengenai aktivitas antifertilitasnya, *Gendarussa vulgaris* Nees sangat potensial untuk dikembangkan sebagai obat antifertilitas untuk pria. Ekstrak diklormetan dan metanol dari daun *Gendarussa vulgaris* Nees antara lain dapat menghambat motilitas dan viabilitas spermatozoa manusia *in vitro* (Prajogo dan Pramono, 1988). Ekstrak tersebut juga dapat menurunkan persentase motilitas, viabilitas, bentuk normal spermatozoa epididimis mencit. Belum diketahui fraksi Polifenol dari *Gendarussa vulgaris* Nees dapat mempengaruhi tingkat fertilitas pada mencit. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui tingkat fertilitas spermatozoa tersebut.

## **1.2. Perumusan Masalah**

1. Apakah fraksi polifenol *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menghambat terjadinya fertilisasi *in vitro* pada mencit ?
2. Apakah fraksi polifenol *Gendarussa vulgaris* Nees dapat mempengaruhi morfologi cumulus oophorus ?

## **1.3. Hipotesa**

1. Fraksi polifenol *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menghambat terjadinya fertilisasi *in vitro* pada mencit.
2. Fraksi polifenol *Gendarussa vulgaris* Nees dapat mempengaruhi morfologi cumulus oophorus.

#### **1.4. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui pengaruh fraksi polifenol daun *gendarussa vulgaris* ness dalam menghambat proses fertilisasi *in vitro*
2. Membuktikan adanya fraksi polifenol *gendarussa vulgaris* ness yang diberikan per oral dapat menurunkan aktifitas enzim hialoronidase spermatozoa mencit dalam mendispersi cumulus oophorus.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Mendukung penelitian dan pengembangan tanaman obat Indonesia di bidang antifertilitas khususnya bidang antifertilitas pada pria yang masih sedikit dilakukan dan diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk melengkapi acuan penelitian sejenis.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Tinjauan tentang Tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees**

##### **2.1.1. Klasifikasi Tanaman**

- Divisi : Spermatophyta
- Anak Divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledoneae
- Anak Kelas : Sympetalae
- Bangsa : Solanales
- Suku : Acanthaceae
- Marga : *Gendarussa*
- Jenis : *Gendarussa vulgaris* Nees  
(*Justicia gendarussa* Bunn. f.)

##### **2.1.2. Nama Daerah Tanaman**

- Sumatera : besi-besi ( Aceh )
- Jawa : handarussa ( Sunda )  
gondarusa, tetean, trus ( Jawa )
- Nusa Tenggara : gandarisa ( Bima )
- Maluku : puli ( Ternate )



### 2.1.3. Morfologi dan Ekologi

*Gandarussa vulgaris* Nees merupakan tanaman setengah perdu tegak, sering bercabang banyak, 0,7 - 0,8 meter tingginya. Batang segi empat tumpul atau cukup bulat, yang muda ungu, yang tua coklat muda. Tangkai daun 5 - 8 mm, helaian daun bentuk lanset, beringgit lebar dan tidak dalam, seperti kulit tipis, 6 - 20 kali 1,5 - 3,5 cm. Bunga terkumpul dalam malai sangat sempit, 3 -12 cm panjangnya, yang tersusun dari anak payung menggarpu yang rapat. Daun pelindung kecil, sempit, runcing dan boleh dikatakan sama. Mahkota gundul, tabung pucat, berbintik ungu. Pinggiran mahkota berbibir dua, bibir bawah bentuk baji hingga bulat telur terbalik, dengan 3 taju meinbulat pendek, putih, pada pangkal ungu, berbintik dan dengan lipatan miring, bibir atas segitiga, runcing, putih, berbintik ungu. Tangkai putik gundul, 6 - 10 mm. Buah bentuk gada, gundul, berbiji empat. Barangkali dimasukkan dari negeri lain, ditanam dan sering menjadi liar, 1 - 1,350 meter. Banyak terdapat di kuburan, pagar, hutan, dan tepi-tepi sungai (Backer and Van Den Brink, 1965).

### 2.1.4. Kandungan Kimia Tanaman

Tanaman ini mengandung senyawa-senyawa : alkaloida yang sedikit beracun, flavonoid, iridoid, triterpen, sterol, minyak menguap dan mempunyai kadar kalium yang tinggi (Hembing dkk., 1998).

### 2.1.5. Kegunaan Tanaman

Daun gandarussa dapat digunakan sebagai penawar nyeri yaitu dengan ditumbuk bersama cuka dan merica dan digunakan terhadap sakit kepala akibat selesma dan dengan kapur sirih serta merica untuk encok ( rematik ). Bersama dengan adas pulasari sebagai obat gosok jika merasa sakit dan pegal pada tulang-tulang. Daun gandarussa juga dapat digunakan untuk mengatur siklus haid, mengeluarkan keringat, mencegah demam dan sebagai pencahar. Akar gandarussa hitam digiling dengan air dapat digunakan sebagai obat terhadap cupak (waterbort) atau upas putih (Hembing dkk., 1998).

## 2.2. Tinjauan Tentang Senyawa Flavonoid

Menurut perkiraan, kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuh-tumbuhan diubah menjadi flavanoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya (Bate, 1972). Jadi flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga bisa ditemukan pula pada setiap telaah ekstrak tumbuhan. Dalam tumbuhan, flavonoid umumnya terikat pada gula sebagai glikosida (Harbane, 1996) dan dalam bentuk aglikon flavonoid ( yaitu flavonoid tanpa gula terikat ) dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6 - C_3 - C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga (Markam, 1998).

Senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis, bergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan dari sistem 1,3 - diarilpropan. Dalam hal ini, flavon mempunyai tingkat oksidasi yang terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa - senyawa turunan flavon. Dari berbagai jenis flavonoid tersebut, flavon, flavonol dan antosianin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam, sehingga sering disebut sebagai flavonoid utama, sedang yang lain jumlahnya terbatas. Seperti diketahui, flavonoid adalah senyawa fenol yang banyak ditemukan di alam. Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan disebabkan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkatan hidroksilasi, alkoksilasi atau glikolasi dari struktur tersebut (Griffith, 1982). Modifikasi flavonoid lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan : penambahan/pengurangan, hidroksilasi ; metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid ; isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid ; metilnasi gugus orto - dihidroksil ; dimerisasi ( pembentukan biflavonoid ) ; pembentukan bisulfat ; dan yang terpenting, glikosilasi gugus hidroksil (pembentukan flavonoid C - glikosida ). Beberapa jenis flavonoid yang berkhasiat sebagai antifertilitas pria antara lain : (+) -katekin, kirantin, dehidrokuersetin, etiodiksilol, naringenin, hesperidin, rutin, xanthorhamnol, kuersetin, ramnetin, tektorigenin (Farnworth and Waller, 1982).

### 2.3. Tinjauan Tentang Sperma

Sperma merupakan cairan seperti susu yang dikeluarkan oleh alat reproduksi jantan. Pada dasarnya terdiri dari dua komponen dasar yaitu :

1. Spermatozoa : merupakan sel yang diproduksi oleh tubulus seminiferus dengan bantuan hormon.
2. Plasma sperma : merupakan cairan hasil sekresi kelenjar asesori alat kelamin jantan. Kelenjar asesori meliputi vesikula seminalis, prostat, dan bulbo uretra.

### 2.3.1. Spermatozoa

Spermatozoa adalah sel germinal pada jantan yang diproduksi di tubulus seminiferus testis oleh sel-sel yang berasal dari epitelium germinal, sel-sel ini disebut spermatogonia. Pembentukan spermatozoa dari spermatogonia dalam tubulus seminiferus dimulai dari tepi berturut-turut ke arah lumen adalah spermatogonium - spermatosit primer - spermatosit sekunder - spermatid - spermatozoa.

Panjang total spermatozoa mamalia berkisar antara 41-250  $\mu$ , tergantung dari spesiesnya. Spermatozoa di produksi testis merupakan sel tunggal yang terdiri dari kepala, leher dan ekor. Bentuk kepala spermatozoa normal pada umumnya oval beraturan, mempunyai ukuran 3-5  $\mu$  kali 2-3  $\mu$  dan tebalnya tidak merata, makin ke bagian depan makin tipis. Pada bagian caudal dilanjutkan ke arah belakang dengan bagian leher yang pendek dan bagian ekor. Bagian ekor berbentuk pipih dan terdiri dari bagian " middle piece " yang panjangnya 5-7  $\mu$  dan tebalnya  $\pm$  1  $\mu$ , makin menipis pada bagian " principal piece " yang panjangnya 45  $\mu$  dan terakhir adalah bagian " end piece " yang panjangnya kira-kira 5  $\mu$ . Bagian ekor merupakan bagian penting untuk pergerakan spermatozoa.

### 2.3.1.1. Fungsi Spermatozoa

Dalam hal kemampuan spermatozoa pada proses fertilisasi maka spermatozoa pada dasarnya mempunyai beberapa fungsi yang harus dipenuhi antara lain migrasi, binding, dan penetrasi. Tentang migrasi, spermatozoa mulai bergerak di dalam epididimis, selama transportasi senyawa spermatozoa menggunakan ATP sebagai sumber utama untuk bergerak maupun keperluan biosintesis. Enzim spermatozoa terutama berasal dari proses glikolisis ATP, dan merupakan energi utama untuk menggerakkan spermatozoa dan telah dibuktikan adanya korelasi antara persentase spermatozoa yang mempunyai motilitas baik dengan konsentrasi ATP. Pergerakan atau motilitas spermatozoa bertujuan agar spermatozoa dapat mencapai ovum untuk pembuahan. Spermatozoa harus dalam keadaan memiliki motilitas yang baik untuk bermigrasi sepanjang saluran reproduksi wanita untuk mencapai tempat fertilisasi (Prajogo dkk, 1994). Spermatozoa ketika melewati epididimis mengalami maturasi dan kemampuan bergerak. Pematangan spermatozoa di epididimis meliputi perubahan bentuk, histokimia, fisiologi, biokimia, biofisik dan perubahan metabolit. Perubahan bentuk yang menyolok yaitu butir sitoplasmik, sisa dari spermatid yang bergerak ke cauda dari leher spermatozoa ke bagian akhir middle piece (Yugo dan Lukman, 1998).

Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas sperma : (1) Kualitas sperma yang ditentukan oleh morfologi spermatozoa, pH, dan viskositas. (2) Waktu, frekuensi antar ejakulasi (3) Suhu (4) Radiasi elektromagnetik

### **2.3.2. Plasma Sperma**

Fungsi plasma sperma adalah sebagai medium untuk mengangkut spermatozoa ke saluran reproduksi wanita disamping sebagai sumber makanan dan proteksi bagi spermatozoa. Spermatozoa yang diambil dari epididimis bisa membuahi sel telur yang subur dengan cara inseminasi buatan, oleh karena itu adanya plasma sperma tidak begitu penting pada proses reproduksi tetapi bagaimanapun juga dia sebagai medium dalam peristiwa perkawinan secara alami (Prajogo dkk., 1997).

Plasma sperma secara faal merangsang motilitas maupun metabolisme spermatozoa yang ada dalam epididimis. Juga bertindak sebagai buffer yang menjaga dari kondisi asam dalam vagina dan adanya prostaglandin yang dapat menyebabkan kontraksi otot polos dari alat reproduksi jantan untuk membantu transpor spermatozoa (Hartati dkk., 1997).

#### **2.3.2.1. Susunan Kimia**

Plasma sperma terdiri dari berbagai komponen antara lain karbohidrat, protein, asam amino, lemak, hormon dan prostaglandin. Komponen spesifik dari prostat ialah fosfatase asam, Zn, dan Mg, sedangkan fruktosa merupakan komponen spesifik dari vesika seminalis. Komponen elektrolit terbesar dalam komponen plasma sperma ialah Na, K, Mg, Ca, dan Cl (Prajogo dkk., 1998).

Tekanan osmose dari plasma sperma sama dengan plasma darah, sebagian besar tekanan osmose dari plasma sperma dihasilkan oleh zat-zat organik dengan berat molekul rendah. Enzim pada plasma sperma terdiri dari enzim proteolitik,

bermacam-macam fosfatase, glikosidase, kolinesterase, diamin oksidase dan laktat dehidrogenase. Plasma sperma terdiri dari epinefrin, norepinefrin, hormon androgen dan hormon estrogen. Vitamin-vitamin yang ada dalam plasma sperma ialah asam askorbat, inositol, dan riboflavin. Suatu senyawa gliserilfosforilkolin (GPC) terdapat dalam konsentrasi yang tinggi dalam plasma sperma beberapa hewan (Prajogo dkk., 1997<sup>b</sup>)

#### 2.4. Tinjauan Tentang Spermatogenesis

Spermatogenesis merupakan perkembangan gamet jantan melalui proses yang kompleks dan teratur. Pada mamalia kematangan sel-sel kelamin pada umumnya melalui suatu rangkaian pola dasar yang melibatkan proses proliferasi dan deferensiasi. Penggolongan tingkat perkembangan sel kelamin merupakan sisi lain dari fungsi testis sebagai penghasil sperma (Hartati dkk., 1997).

Spermatogenesis pada hewan mengerat dalam satu strain adalah tetap sama tetapi berbeda jika strainnya berlainan. Waktu yang dibutuhkan untuk spermatogenesis pada mencit adalah 34,5 hari. Empat tahapan diperlukan untuk melengkapi proses yang terjadi dari mulai memproduksi spermatogonia tipe A menjadi spermatogonia tipe B, spermatosit, spermatid, dan spermatozoa (Hartati dkk., 1997). Spermatogenesis pada mamalia telah banyak diketahui dan secara umum terdiri dari : proliferasi, pertumbuhan, pematangan dan metamorfosa (Lestari dkk., 1997).



## 2.5. Tinjauan Tentang Epididimis

Epididimis adalah suatu saluran panjang yang melingkar, dipakai spermatozoa yang berasal dari testis menuju ke vasa deferens. Bagian proksimal saluran epididimis menghasilkan sesuatu untuk absorpsi cairan dan kemudian pematangan spermatozoa, sedangkan bagian distal bekerja sebagai reservoir untuk menyimpan spermatozoa. Epididimis dapat dibagi menjadi tiga bagian yaitu caput, corpus dan cauda. Struktur dan fungsi epididimis tergantung dari androgen yang disuplai dari cairan testis (Prajogo dkk., 1998).

Spermatozoa waktu melewati epididimis mengalami maturasi. Epididimis mempunyai fungsi sekresi dan absorpsi. Sekresi plasma epididimis untuk pematangan spermatozoa. Cairan testis yang membawa spermatozoa dari tubulus diresorpsi di epididimis. Pematangan spermatozoa di epididimis meliputi perubahan morfologi, histokimia, fisiologi, biokimia, dan biofisik. Perubahan morfologi yang paling mencolok yaitu droplet sitoplasma, sisa sitoplasma dari spermatid yang bergerak ke kauda dari leher spermatozoa ke bagian akhir dari middle piece, droplet sitoplasma dibedakan dengan adanya enzim lisosom yang terlibat pada akhir maturasi spermatozoa di epididimis.

Aktivitas metabolik spermatozoa meningkat begitu melewati epididimis sehingga menyebabkan perubahan maturasi. Perubahan biokimia pada epididimis dapat memainkan peranan yang besar pada pematangan spermatozoa. Jadi dalam epididimis spermatozoa mengalami pematangan dan kemampuan untuk motilitas dan penetrasi (Prajogo dkk., 1998).



## 2.6. Tinjauan Tentang Ovum

Ovum merupakan substansi yang dihasilkan oleh oogonium melalui proses oogenesis. Ovum terdiri dari unit sitoplasma yang akan mengalami akumulasi selama proses maturasi ovum. Sitoplasma ini terdiri dari protein, ribosom, tRNA, mRNA, dan faktor morphogenis. Lapisan luar dari sitoplasma disebut plasma membran. Membran ini mengatur keseimbangan ion antara luar dan dalam sel selama proses fertilisasi disamping itu harus mampu mengadakan fusi dengan plasma membran dari sperma. Selanjutnya diatas plasma membran ini terdapat lapisan yang disebut lapisan vitelline membran yang merupakan suatu senyawa glycoprotein. Ovum diseliputi oleh tiga lapisan dari luar ke dalam yang meliputi cumulus oophorus, zona pellucida, dan membran vitelin. Lapisan pertama terdiri dari sel-sel yang terdapat dalam matriks glikoprotein, sedangkan lapisan ketiga merupakan lapisan nonseluler dan terdiri dari mukopolisakarida dan mukoprotein. Pada saat proses fertilisasi sudah berlangsung antara membran vitelline dan zona pellucida terdapat ruangan yang dinamakan ruangan perivitelline. Lapisan corona atau cumulus tertanam dalam suatu matriks yang komposisinya sebagian besar terdiri dari asam hialuronat (Lestari dkk., 1997).

## 2.7. Tinjauan Tentang Fertilisasi

Fertilisasi adalah suatu proses dimana dua sel kelamin ( gamet ) mengalami fusi ( penggabungan ) untuk membentuk individu baru yang mengandung atau membawa gen dari kedua induknya. Fertilisasi dapat dibagi dalam dua bagian aktivitas, yaitu :

- ✓ Penggabungan gen yang berasal dari dua induknya
- ✓ Reproduksi ( pembentukan organisme baru )

Fungsi pertama dari fertilisasi adalah meliputi transmisi gen induk pejantan pada keturunannya, dari yang kedua yaitu mengawali reaksi dalam sitoplasma sel telur. Walaupun proses detail dari fertilisasi sangat bervariasi dari spesies satu dengan spesies lain, konsep fertilisasi secara umum dapat dibagi menjadi empat bagian besar yaitu :

1. Kontak dari pengenalan antara sperma dengan sel telur dimana sperma dari sel telur pada umumnya berasal dari satu spesies
2. Regulasi pemasukan sperma ke dalam sel telur dimana pada selaput vitellin hanya mengadakan tahanan pada satu spermatozoa sedangkan spermatozoa yang mampu menembus zona pellucida ditampung di perivitellin sebagai spermatozoa suplementer
3. Terjadinya fusi antara material genetik spermatozoa dengan sel telur
4. Pengaktifan metabolisme sel telur untuk memulai perkembangan

Para ahli menyatakan bahwa saluran reproduksi wanita memegang peranan penting dalam proses fertilisasi. Cairan ejakulat yang baru keluar tidak akan mampu mengalami reaksi akrosom tanpa tinggal dalam waktu tertentu di dalam saluran reproduksi wanita. Hal ini penting untuk terjadinya reaksi kapasitasi. Pada proses *in vitro* hal ini dapat dilakukan dengan sentrifugasi (Gilbert, 1988).

Pada spermatozoa mamalia reaksi akrosom dimulai oleh kapasitasi. Dalam proses kapasitasi terjadi pelepasan inhibitor proteinase dan proses ini merupakan

hal yang penting sekali karena inhibitor tersebut bila tidak dilepaskan akan menghambat kerja enzim proteinase yang terdapat dalam akrosom. Menurut beberapa ahli reaksi akrosom terjadi sebelum atau segera setelah kepala spermatozoa menempel pada ovum. Pada reaksi ini terjadi fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori, dan dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisa lapisan-lapisan yang menyelimuti ovum (Liu and Baker., 1992).

## 2.8. Tinjauan Tentang Mencit

Mencit dengan nama latinnya *Mus musculus* merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam penelitian biomedik modern. Banyak varietasnya, ukuran yang sesuai, subur, waktu penyiapan pendek, mudah pemeliharaannya (Smith and Mangkuwijaya, 1988)

Mencit peka atau tahan terhadap penyakit-penyakit yang dialami manusia. Karena itu binatang ini sering digunakan di bidang genetika, imunologi, biologi seluler, dan onkologi (Prajogo dkk., 1999). Lama hidup mencit 1 - 2 tahun, ada yang mencapai 3 tahun. Umur dewasa 35 hari, kawin 8 minggu, berat dewasa 20 – 40 g (jantan) dan 18-35 g (betina) (Prajogo dkk., 1997<sup>b</sup>).

Pada mencit, spermatositogenesis membutuhkan waktu kira-kira 8 hari, meiosis lengkap diperkirakan 13 hari, dan spermiogenesis kira-kira 13,5 hari. Jadi proses spermatositogenesis pada mencit memerlukan waktu lebih kurang 34,5 hari (Morse, 1981)

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Bahan Penelitian**

##### **3.1.1. Bahan untuk pembuatan ekstrak**

Bahan sampel berupa daun yang dikumpulkan dari tanaman yang tumbuh di wilayah Trawas Mojokerto. Asal tanaman sebelumnya diidentifikasi di Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan digiling dengan alat penggiling.

##### **3.1.2. Bahan**

Butanol, metanol, kloroform, N-heksan, medium M-16, PBS (Phosphat buffer Saline), HCG (Chorulon), PMSG (Foligon), mineral oil, BSA (Bovine serum albumin)

##### **3.1.3. Hewan coba**

Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan dan betina galur balb C, umur  $\pm$  2 bulan mempunyai berat badan 20-30 g yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya.

### **3.2 Alat-alat Penelitian**

Mikroskop inverted, mikropipet berbagai ukuran (sorek), timbangan analitik, ultrasonic, inkubator CO<sub>2</sub>, autoclaf, cawan petri (nuclon), rotary evaporator, maserator, pinset dan gunting steril, laminar airflow, counter, spuit injeksi berbagai ukuran, pipet pasteur

### **3.3. Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri :

1. Variabel bebas (independent variable) adalah dosis fraksi polifenol *Gendarusa vulgaris* Ness yang diberikan pada mencit jantan selama 53 hari.
2. Variabel tergantung (dependent variable) adalah angka fertilisasi dan jumlah sel granulosa.
3. Variabel terkontrol adalah umur tikus, kualitas pakan yang diberikan, sanitasi laboratorium dan medium.

### **3.4. Metode Penelitian**

#### **3.4.1. Pembuatan Ekstrak**

Daun *Gendarussa vulgaris* Nees diekstraksi dengan pelarut heksan secara perkolasi-maserasi sehingga didapatkan ekstrak heksan, kemudian diuapkan. Sisa bahan serbuk kering yang tidak larut dalam heksan diekstraksi secara perkolasi-maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, kemudian diuapkan sampai kering dalam rotavapor dan kemudian diuapkan sampai kering dalam lemari asam. Terhadap ekstrak kering yang didapat, dilakukan partisi kloroform-air. Fasa

kloroform dan air dipisahkan, fasa kloroform diuapkan sampai kering di dalam lemari asam. Sedangkan fasa air diekstraksi lagi dengan pelarut n-butanol. Fasa air dipisahkan, fasa n-butanol diuapkan dalam rotavapor dan akan terbentuk endapan isolat berwarna krem.

#### **3.4.2. Uji Fertilitas Mencit Jantan**

Seluruh mencit jantan yang akan digunakan untuk sampel percobaan penelitian dikawinkan secara alami dengan mencit betina yang sebelumnya sudah dilakukan superovulasi, dengan metoda "single matting". Hanya mencit jantan yang terbukti fertil yang digunakan sebagai sampel penelitian.

#### **3.4.3. Pengambilan Sampel Hewan Coba**

Sampel untuk keperluan uji aktivitas diambil dan mencit jantan fertil, sampel diambil secara acak dan jumlah sampel untuk setiap perlakuan terdiri dari:

- a. kelompok perlakuan I : 10 ekor (fraksi polifenol 15 mg / 20 g bb)
- b. kelompok perlakuan II : 10 ekor (fraksi polifenol 30 mg / 20 g bb)
- c. kontrol negatif : 10 ekor (diberi air suling)

#### **3.4.4. Tahapan Proses Fertilisasi *In Vitro***

##### **3.4.4.1. Dosis Dan Perlakuan Hewan Coba**

Dosis ekstrak diberikan dalam mg zat/g berat badan mencit. Ekstrak diberikan dalam bentuk larutan secara per-oral satu kali sehari. Berat badan mencit adalah berat badan yang diperoleh dari penimbangan setiap minggu. Lama

pemberian larutan ekstrak disesuaikan dengan 1,5 kali siklus spermatogenesis mencit yaitu selama 55 hari.

#### **3.4.4.2. Pengambilan Sperma Mencit**

1. Mencit dikorbankan dengan cara diskolasi tulang leher.
2. Desinfeksi dengan alkohol 70%, kemudian skrotum dibedah dengan cepat.
3. Testis kanan-kiri palpasi
4. Sperma diambil dengan memotong bagian cauda epididimis
5. Cuci dengan larutan saline untuk menghilangkan lemaknya kemudian lanjutkan cuci dengan menggunakan media M16.

#### **3.4.4.3. Pembuatan Drop Untuk Medium Kultur**

1. Disiapkan cawan petri (nuclon) steril untuk drop medium kultur dan untuk drop pencucian sel telur.
2. Masing - masing cawan diisi dengan 4-5 drop M16 yang ditutup dengan mineral oil, kemudian diinkubasi dalam inkubator. (1 drop = 25  $\mu$ l)
3. Untuk pencucian sel telur juga dibuat drop PBS dan drop M16, masing-masing sebanyak 3 drop yang ditutup dengan mineral oil, kemudian diinkubasi dalam inkubator. (1 drop = 50  $\mu$ l )

#### **3.4.4.4. Koleksi Sel Telur dan Fertilisasi *In Vitro***

1. Mencit betina disuperovulasi dengan menggunakan 5 IU PMSG secara intraperitoneal, 48 jam kemudian diikuti dengan 5 IU HCG secara intraperitoneal.
2. Setelah pembedahan HCG, mencit betina langsung dikawinkan secara "single mating" dengan pejantan vasektomi.
3. Terjadinya perkawinan dapat dilihat dari adanya sumbat vagina pada betina positif kawin pada keesokan paginya.
4. Mencit dibedah dengan cepat, bagian tuba fallopii kanan dan kiri diangkat
5. Cuci dengan larutan PBS, kemudian dilanjutkan dengan media M16. Amati dibawah mikroskop.
6. Koleksi sel telur dilakukan dengan mencari kantung fertilisasi, kemudian disobek pelan-pelan dengan canula steril.
7. Sel telur yang telah dipanen dicuci dengan drop PBS sebanyak 3 kali kemudian dilanjutkan dengan drop media M16 sebanyak 3 kali.
8. Sel telur yang telah dicuci dipindahkan ke drop medium kultur M16.
9. Sperma dari pejantan diambil dengan spatula kaca dan ditenamkan dalam drop medium kultur M16 yang telah berisi sel telur.
10. Diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 7 jam pada suhu 37°C

#### **3.4.4.5. Parameter Yang Diamati**

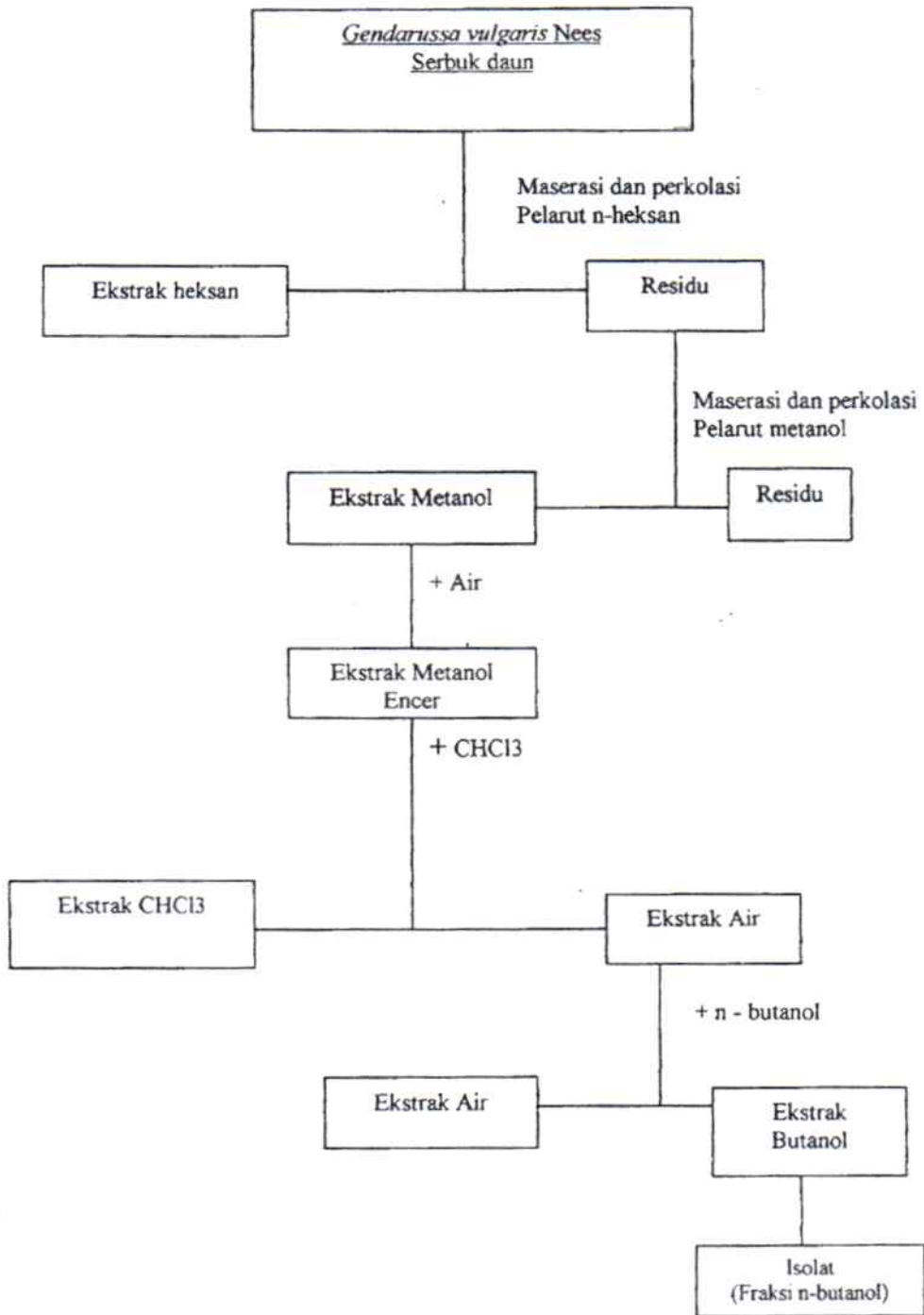
Setelah inkubasi 7 jam kemudian dapat diamati hasilnya dibawah mikroskop. Apabila terjadi fertilisasi maka sel granulosanya sudah tidak intact



lagi, terbentuknya pronukleus jantan dan betina, adanya kepala dan ekor spermatozoa pada inti sel telur serta telah terbentuknya zigot. Apabila tidak terjadi fertilisasi maka sel granulosanya akan tetap intact, tidak terbentuk pronukleus jantan dan betina, tidak adanya kepala dan ekor spermatozoa pada inti sel telur serta belum terbentuknya zigot.

### **3.5. Pengolahan Data**

Data dikumpulkan berdasarkan pengamatan terhadap jumlah sel granulosa serta diamati terjadi fertilisasi atau tidak dari setiap kelompok perlakuan. Pada masing-masing data tersebut dianalisa statistik dengan rancangan penelitian acak lengkap (RAL) anova (Steel and Torrie, 1980). Adapun perhitungannya digunakan SPSS dari program Windows.



Gambar 1. Skema ekstraksi daun gendarussa



## BA B IV

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Hasil Ekstraksi Daun Gandarusa

Sebagai bahan penelitian adalah daun gandarusa yang telah dideterminasi di laboratorium Botani Farmasi Farmakognosi jurusan Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Daun yang telah di serbuk kemudian diekstraksi secara perkolasi-maserasi dengan n-heksan, kemudian sisa yang tidak larut dalam heksan diekstraksi dengan metanol. Dilakukan partisi kloroform-air terhadap ekstrak kering metanol. Fasa kloroform dan air dipisahkan kemudian fasa air diekstraksi lagi dengan pelarut n-butanol. Fasa air dipisahkan dan fasa n-butanol diuapkan dalam rotavapor sampai terbentuk endapan isolat berwarna krem.

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun gandarusa

<b>Ekstrak</b>	<b>Berat</b>	<b>Prosentase (%)</b>
1. Heksan	14,8 g	3,7
2. Metanol	659 g	16,5
3. Butanol	49,2 g	1,23

#### 4.2. Data Hasil Uji Fertilisasi In Vitro

Tabel 2. Data hasil uji fertilisasi *in vitro*

No. urut	K			G I			G II		
	No. mencit	Fertilisasi	Sel granulosa	No. mencit	Fertilisasi	Sel granulosa	No. mencit	Fertilisasi	Sel granulosa
1	1	+	*	1	-	√	1	-	√
2	2	+	*	3	-	√	3	-	√
3	3	+	*	4	-	√	4	-	√
4	4	+	*	6	-	√	6	-	√
5	5	+	*	7	-	√	7	-	√
6	6	+	*	8	-	√	8	-	√
7	7	+	*	9	-	√	9	-	√
8	8	+	*	10	-	√	10	-	√
9	9	+	*	11	-	√	12	-	√
10	10	+	*	13	-	√	13	-	√

Keterangan :

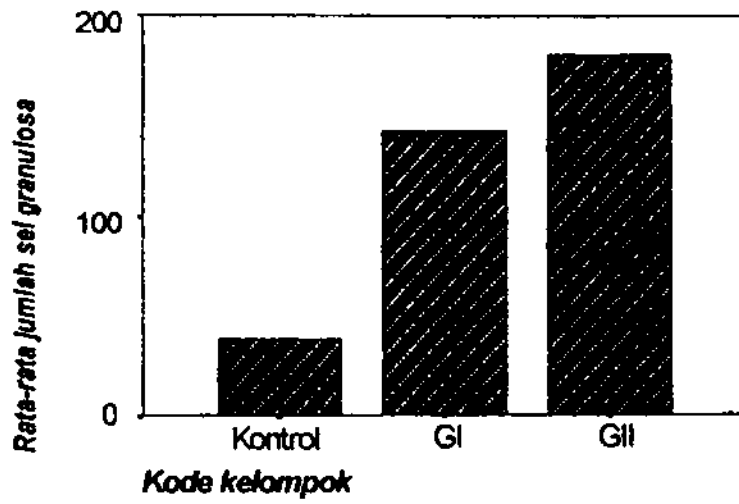
- G I : dosis 15 mg/20 g bb mencit  
 G II : dosis 30 mg/20 g bb mencit  
 Kontrol : kontrol (-) diberi air suling  
 + : terjadi fertilisasi setelah 7 jam inkubasi  
 - : tidak terjadi fertilisasi setelah 7 jam inkubasi  
 \* : sel granulosa sudah tidak intact lagi  
 √ : sel granulosa tetap intact

Tabel 3. Data pengamatan jumlah sel granulosa

No. urut	Kontrol		G I		G II	
	No. Mencit	Sel Granulosa	No. Mencit	Sel Granulosa	No. Mencit	Sel Granulosa
1.	1	56	1	197	1	177
2.	2	58	3	190	3	193
3.	3	27	4	126	4	184
4.	4	27	6	158	6	183
5.	5	28	7	137	7	171
6.	6	18	8	129	8	195
7.	7	49	9	117	9	199
8.	8	60	10	122	10	172
9.	9	34	11	127	12	170
10.	10	27	13	125	13	166
x		38,40		147,25		182,36
SD		15,66		30,89		11,94

Keterangan

- G I : dosis 15 mg/20 g bb mencit  
 G II : dosis 30 mg/20 g bb mencit  
 Kontrol : kontrol (-) diberi air suling



Gambar 2. Diagram batang rata-rata jumlah sel granulosa

Keterangan

- G1 : dosis 15 mg/20 g bb mencit
- GII : dosis 30 m g/20 g bb mencit
- Kontrol : kontrol (-) diberi air suling



Gambar 3. Sel spermatozoa mencit (400 X)

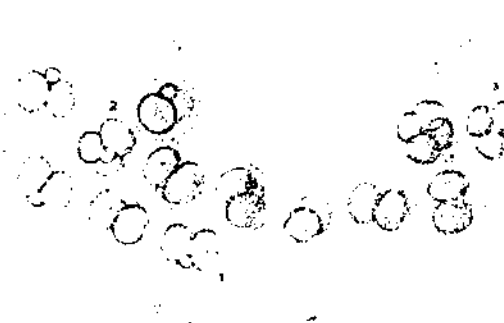
Gambar 4. Sel telur mencit (400 X)



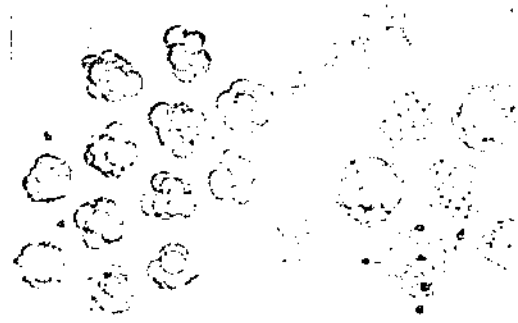
Gambar 5. Proses fertilisasi in vitro (100X)



Gambar 6. Zigot menciit(400 X)



Gambar 7. Perkembangan Embrio menciit  
(1) Embrio tahap dua sel  
(2) Embrio tahap tiga sel  
(3) Embrio tahap empat sel



Gambar 8. Perkembangan Embrio menciit  
(4) Embrio tahap delapan sel  
(5) Embrio tahap morula  
(6) Embrio tahap blastosis  
(a) Blastosol (b) ICM (c) Tropoblas  
(d,e) Zona Pelusida

## **BAB V**

### **PEMBAHASAN**

Tanaman gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) sudah banyak digunakan di dalam masyarakat untuk pengobatan. Salah satunya dengan menggunakan daunnya untuk menjarangkan kelahiran di Irian Jaya yang banyak dipakai oleh kaum laki-lakinya. Dilihat dari kandungannya, tanaman ini mengandung terpenoid, flavonoid, alkaloid, tanin dan kalium. Dari penelitian sebelumnya, diketahui ada beberapa komponen yang diduga berfungsi sebagai inhibitor enzim hialuronidase, yaitu suatu enzim yang berperan penting dalam proses fertilisasi, dan komponen tersebut sebagian besar merupakan golongan senyawa flavonoid. Maka senyawa flavonoid inilah yang diduga memiliki efek antifertilitas seperti umumnya tanaman lainnya yang berefek antifertilitas.

Dalam penelitian ini, serbuk daun gandarusa diekstraksi secara perkolasi-maserasi dengan menggunakan pelarut n-heksan. Pelarut ini berfungsi untuk menanak zat-zat pengganggu seperti : klorofil, pigmen zat warna, lemak dan senyawa pengganggu lainnya. Kemudian ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut metanol, yang berfungsi untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid yang juga merupakan senyawa polifenol, yaitu adanya satu atau lebih gugus hidroksi pada dua cincin aromatis. Terhadap ekstrak kering metanol kemudian dilakukan partisi kloroform - air. Fasa kloroform dan air dipisahkan. Dalam fasa kloroform akan terlarut sisa-sisa zat pengganggu seperti klorofil, alkaloid bebas sehingga hal ini menyebabkan fasa airnya berwarna kekuningan. Selanjutnya ekstrak air diekstraksi dengan n-butanol

dan dalam pelarut ini akan terlarut senyawa -senyawa flavonoid dalam bentuk glikosida.

Pengambilan spermatozoa mencit dilakukan dengan jalan pembedahan, keudian memotong bagian cauda epididimisnya. Untuk mengetahui bahwa mencit yang digunakan betul - betul memiliki kualitas sperma yang bagus, maka sebelumnya dilakukan uji fertilitas dengan jalan mengawinkan mencit jantan dengan mencit betina secara alami. Pengambilan spermatozoa dilakukan pada bagian cauda epididimis karena pada bagian inilah tempat penampungan spermatozoa yang matang dan motil.

Pada proses koleksi sel telur dilakukan pembilasan dan pencucian sel telur sebanyak 3 kali dengan menggunakan PBS dan media M16. Hal ini dimaksudkan untuk menjami agar sel telur yang dipakai betul-betul bersih dan bebas dari segala kontaminan yaitu : udara disekitar tempat penelitian, udara pemapasan serta kontaminan yang berasal dari peralatan yang digunakan. Disamping itu kontaminan lainnya bisa berupa lemak dan darah, yang apabila tertinggal dalam sel telur maka lama -lama akan bisa membentuk fibrin yang bisa mengganggu proses fertilisasi serta sekaligus toksik terhadap sel telur itu sendiri.

Dari hasil uji fertilisasi *in vitro* (IVF), terlihat bahwa semua mencit pada kelompok kontrol terjadi fertilisasi setelah inkubasi selama 7 jam. Terjadinya fertilisasi ini ditandai dengan sel granulosanya yang tidak intact (utuh) lagi dan telah terbentuknya zigot. Sedangkan pada kelompok perlakuan dengan dosis 15 mg/20g bb ( GI ) dan dosis 30 mg/20g bb ( GII ) tidak terjadi fertilisasi setelah inkubasi selama 7 jam. Tidak terjadinya fertilisasi ini ditandai dengan sel



granulosanya yang tetap intact dan tidak terbentuknya zigot. Tidak terjadinya fertilisasi pada kelompok perlakuan ini, disebabkan oleh karena terjadinya kegagalan penetrasi spermatozoa pada sel telur akibat adanya senyawa penghambat enzim hialuronidase yang terdapat pada kepala spermatozoa yang sangat berperan dalam proses fertilisasi (Prajogo, 2002). Adapun senyawa yang dimaksud yaitu senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak polifenol daun gandarusa. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, bahwa ada beberapa komponen diketahui mempunyai aktivitas sebagai inhibitor enzim hialuronidase yang sebagian besar merupakan golongan senyawa flavonoid.

Dan dari penghitungan statistik terhadap parameter yang dapat diukur yaitu terhadap jumlah sel granulosa maka didapatkan harga F hitung 124,337 lebih besar dari F tabel 3,32. Hal ini berarti ada perbedaan yang bermakna diantara ketiga perlakuan. Kemudian untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda, dilanjutkan dengan uji HSD dan dari uji ini diketahui bahwa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan G1 dan GII serta ada pula perbedaan yang bermakna antara G1 dengan GII. Ini menunjukkan dosis yang berbeda akan membenkan efek hambatan penetrasi spermatozoa yang berbeda pula.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan tersebut di atas dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Fraksi polifenol dosis 15 mg/20g bb dan dosis 30mg/20g bb dapat menghambat terjadinya fertilisasi *in vitro* ditandai dengan tidak terbentuknya zigot.
2. Fraksi polifenol dosis 15 mg/20g bb dan dosis 30 mg/ 20g bb tidak menyebabkan dispersi cumulus oophorus atau sel granulosa.

#### 6.2. Saran

Dari penelitian tersebut di atas dapat disarankan hal-hal sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme penghambatan penetrasi spermatozoa pada sel telur mencit dari ekstrak polifenol dengan melihat aktivitas enzim hialuronidasenya.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kemampuan ke keadaan semula (sifat reversibilitas) dimana kemampuan penetrasi kembali seperti semula setelah pemberian ekstrak polifenol.
3. Perlu diteliti lebih lanjut mengenai susunan senyawa aktif yang berfungsi sebagai penghambat enzim hialuronidase.

## DAFTAR PUSTAKA

- Backer, CA., and RCB van Den Brink. 1965. Flora of Java, Vol II, NVP. Noordhoff Groningen, Netherland. h. 589-590
- Bate Smith, E.C. 1972. Journal of Phytochemistry. h.1755
- Burkman.1995. The motility of human spermatozoa before and after Capacitation dalam Gametes the spermatozoon, editor Grudzinskas and J.L. Yovich, Cambridge University Press, cetakan pertama, h.123.
- Didiet, E. 1995. Studi Fitokimia dan Farmakognosi daun Gondorusso (*Justicia gandarussa* Burm f) dalam Penelitian beberapa tanaman obat di beberapa perguruan tinggi di Indonesia (Lucie W dkk, Eds), Mid VII, Departemen Kesehatan RI, Hal. 148.
- Farnsworth, NR. dan DP. Waller., 1982, Current Status of Plant Products Reported to Inhibit Sperm dalam Research frontiers in fertility Regulation. No. 2, Januari, h. 1-16.
- Gilbert, SF.1988. Developmental Biology, edisi kedua, Sinauer Association, Inc. Publisher, Sunderland,Massachusetts, h. 313-330.
- Griffith, LA. 1982 Mamalian Metabolism of Flavonoida, dalam Advances in research (J.B. Harborne and TJ. Marby, Eds) Chapman and Hall, London-New York, h. 681-715.
- Harbone J.B. 1996. Metode Fitokimia, Terbitan ke-2, Institut Teknologi Bandung, Bandung, h.70-71.
- Hartati,A., Sutarjadi, B. Prajogo., dan P.Onny .1997. Pengaruh pemberian peroral ekstrak diklormetan dan ekstrak metanol daun Gendarussa vulgaris Nees terhadap spermatozoa epididimis mencit, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.
- Hegnauer, R. 1973. Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 6, Biirckhauzer verlag base] and Stutgart, h.611.
- Hembing W., S. Dalimartha., dan Wirian. 1998. Tanaman Berkhasiat Obat diIndonesia, edisi 4, Pustaka Kartim , Jakarta, h.7, 44-45.
- Lestari,S., Sutarjadi, A.Hinting. dan B. Prajogo.1997. Pengaruh ekstrak diklormetan dan metanol daun Gendarussa vulgaris Nees. terhadap aktivitas enzim hialuronidase spermatozoa pads kumulus ooforus ovum manuis in vitro, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.

- Li, MW., Al.Yudin, V. Voort., Sabeur, K., Primakoff, P and Overstreet, JW. 1997. Inhibition of Monkey Sperm Hyaluronidase Activity and Heterologous Cumulus Penetration by Flavonoid dalam Biol. Reprod., 56:6, Jum, h.1383-1389.
- Liu and Baker. 1992. Test of human sperm function and fertilization in vitro dalam Fertility and Sterility, Vol.58 No. 3, September 1992, h.472-473.
- Linker A. 1971. Hyaluronidase : Method of enzymatic analysis (HU Bergmeyer, Ed), edisi kedua, Vol. 2., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc New York and London, h. 943-948.
- Mann, T and C. Lutwak-Mann. 1981. Male reproductive function and semen, Themes and trend in pshiology, biochemistry and andrology, Springer-verlag Berlin Heidelberg New york, h. 225-233.
- Markham.. 1981. Cara Mengidentifikasi Flavonoida, cetakan kedua, Institut Teknologi Bandung, h. 1 -3.
- Meyer K., Hoffman and Linker A.1960. Hyaluronidase : The enzymes, edisi kedua, (P.D. Boyer, Eds), Vol. 4, Academic Press, New York-London, h. 447-459.
- Moeso,S., dan P.Agus. 1985. Laporan Perjalanan ke Jayapura Sentani (Irian Jaya), Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, h.19.
- Morse, H.C.,1981, The Laboratory Mouse A historical Perspective dalam The Mouse in Biomedical Research, Vol. I, editor Henry L. Foster, dkk., Academic Press, Inc., Boston, h. 1.
- Oeberg, E.F.1952. Duration spermatogenesis in mouse and timing of the stage of cycle of seminiferus epithelium dalam The American Journal of Anatomy, Vol. 19, 1952, Hal. 507-515.
- Prajogo, E.W., dan S. Pramono. 1988. Isolasi Glikosida flavonoid dari daun gandarussa ( *Justicia gendarussa* Burm. f.), Simposium Penelitian Tumbuhan Obat VI, Jakarta.
- Prajogo, E.W., Khoiril A., IGP Santa dan Soehamo. 1997. Pengaruh ekstrak diklormetan dan ekstrak metanol daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap spermatogenesis mencit, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.
- Prajogo, E.W., Emmy K., Suhartono, Imam R., Noor I., dan IGP Santa.. 1994. Bioactivity study on decoction and ezstracs of *Justicia gandarussa* Burin. f. ASOMPS VIII, UNESCO, Melaka, Malaysia.

- Prajogo, E.W., Matty NS., IGP Santa dan Onny P.S.1998. Pengaruh ekstrak diklormetan dan metanol daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap aktivitas enzim akrosin spermatozoa kelinci, POKJANAS TOI XVII, Malang.
- Prajogo, E.W., Widjiati dan Epy M.L.1999. Uji toksisitas daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap gambaran dash dan histopatologi hati, ginjal, dan usus mencit jantan, Lembaga Penelitian UNAIR.
- Prajogo,E.W., Widjiati, Hamdani dan A. Hinting. 1997. Hambatan hesperidin terhadap penetrasi spermatozoa mencit dalam proses fertilisasi in vitro, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.
- Prajogo, B.E.W. 2002. Aktifitas anti fertilitas flavonoid daun *justicia Gendarusa* Burm F. Desertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- Siti, S. 1995. Khasiat *gandarussa* sebagai obat tradisional, *Warta APINMAP Indonesia*, Tahun V, Vol V, No. 1, h.8-9.
- Smith, J.B., dan Mankoewidjoyo, S., 1988, Pemeliharaan, pembiakan, dan Penggunaan hewan percobaan di daerah tropis, Universitas Indonesia, h.10-11.
- Steel. RGD., dan Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics, A biometrical Approach*, edisi ke-2, Mc Graw-Hill Inc, USA, h. 236.
- Steenis, Van C.G.G.J.1949. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, Terjemahan, Pradnya Pramita, h.393-394.
- Syahrin, H.,Kamaludin,Arjatmo,T.,1994, *Reproduksi dan Embriologi*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, h.11-20.
- Wahyudi, R., Sutarjadi, B. Prajogo. dan A.Hinting. 1997. Pengaruh ekstrak metanol dan ekstrak diklormetan daun *Gendarussa vulgaris* Nees. Terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa manusia in vitro, Simposium penelitian bahan Obat Alami IX, Yogyakarta.
- Whittingham, D.G. dan Wood M.J. 1992. *Reproductive Physiology dalam The Mouse in Biomedical Research*, Vol. III, editor Henry L. Foster dkk., Academic Press, Inc., Boston, h.140.
- Yugo, S dan Lukman H.1998. Pengaruh pemberian infus daun *gandarussa* (*Justicia gandarussa* Bumf.) terhadap spermatogenesis tikus putih (*Rattus norvegicus*), *Medika*, No 8, Tahun XXIV, 1998, h.505-511.

Zanaveld, LJD. 1976. Sperm enzym inhibitors and antifertility agents dalam Human semen and fertility regulation in men, E.S.E. Hafez (Ed), CV. Mosby Company, St Louis, London, h. 576-578.

## LAMPIRAN I

## Descriptives

## Jumlah Sel Granulosa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	10	38.40	15.66	4.95	27.20	49.60
GI	12	147.25	30.89	8.92	127.62	166.88
GII	11	182.36	11.94	3.60	174.35	190.38
Total	33	125.97	64.04	11.15	103.26	148.68

## Descriptives

## Jumlah Sel Granulosa

	Minimum	Maximum
Kontrol	18	60
GI	117	199
GII	166	199
Total	18	199

## ANOVA

## Jumlah Sel Granulosa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Si g.
Between Groups	117101.774	2	58550.887	124.337	.000
Within Groups	14127.195	30	470.907		
Total	131228.970	32			

## Multiple Comparisons

## Dependent Variable: Jumlah Sel Granulosa Tukey HSD

(I) Kode kelompok	(J) Kode kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Si g.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	GI	-108.85*	9.292	.200	-131.78	-85.84
	GII	-143.96*	9.482	.000	-167.34	-120.59
GI	Kontrol	108.85*	9.292	.000	85.94	131.76
	GII	-35.11*	9.058	.002	-57.44	-12.78
GII	Kontrol	143.96*	9.482	.000	120.59	167.34
	GI	35.11*	9.058	.002	12.78	57.44

## LAMPIRAN 2

### Pengenceran hormon Foligon (PMSG) dan Chorulon (HCG)

1. Injeksi PMSG 5 IU /0,05 ml

Caranya : 1 ampul + 5 ml pelarut = 1000 IU / 1000  $\mu$ l

Ambil 1 ml = 200 IU / 100  $\mu$ l

(+) 1 ml pelarut = 5 IU / 0,05 ml

2. Injeksi HCG 5 IU/0,05 ml

Caranya : 1 ampul + ml pelarut = 1500IU / 1000  $\mu$ l

Ambil 1 ml = 300 IU / 100  $\mu$ l

(+) 2 ml pelarut = 5 IU / 0,05 ml



## LAMPIRAN 3

## Komposisi medium M 16

	gr/l
1. NaCl	5,333
2. KCl	0,356
3. CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,252
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162
5. MgSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,293
6. NaHCO <sub>3</sub>	2,101
7. Na laktat 60%	2840 µl
8. Na piruvat	0,036
9. Glukosa	1,00
10. BSA	4,00
11. Penicillin	0,06
12. Streptomisin	0,05
13. Aquabides	1 liter

- 1 JUL 2005

**PAMERAN**