

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat di Indonesia telah dilakukan sejak lama terutama sebagai bahan obat tradisional. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat tradisional menunjukkan kecendrungan meningkat. Hal ini tampak dari nilai peredaran obat tradisional pada tahun 1979 mencapai Rp.3,1 milyar, pada tahun 1981 meningkat menjadi Rp 10,6 milyar (Sutarjadi, 1983). Bahkan di Negara-negara Barat tumbuhan tetap menjadi bahan dasar obat yang penting. Menurut Farnsworth (1984) data National Prescription Audit (NPA) di Amerika Serikat memuat informasi bahwa 25% obat yang digunakan oleh masyarakat Amerika Serikat masih mengandung obat yang bahannya berasal dari tumbuhan. Sekitar 100 bahan obat pada saat ini masih diekstraksi dari tumbuhan (cit Berg, 1987).

Pada tahun 1960 seorang anak penderita leukemia akan mempunyai kemungkinan hidup 20%. Saat ini setelah ditemukannya obat yang berasal dari *rosy periwinkle* (*Vinca rosea*) suatu tumbuhan yang tumbuh di hutan-hutan tropika, penderita mempunyai kemungkinan hidup 80%. Perdagangan bahan obat ini telah mencapai nilai 100 juta USD setiap tahun (Myers 1984). Jelas tampak betapa

pentingnya peranan tumbuhan sebagai penyedia bahan obat.

Di alam terdapat 250.000 jenis tumbuhan dimana 70% dari tumbuhan ini tumbuh di Negara-negara berkembang di daerah tropika. Dari tumbuhan ini baru sekitar 1% yang diteliti potensi ekonominya (Myers, 1984). Di India selama dua dasa warsa terakhir ini telah diuji 3000 jenis tumbuhan atas kemungkinannya mengandung bahan berkhasiat. Sebagai hasil uji ini beberapa obat baru telah digunakan pada praktek-praktek klinik sedang sebagian yang lain masih dalam uji klinik lanjut (Anand, 1984).

Tumbuhan dapat mengandung bahan berkhasiat dan tidak berkhasiat. Sering dilakukan kesalahan didalam mencari bahan berkhasiat dalam tumbuhan yaitu membuang bahan-bahan tidak berkhasiat tanpa dilakukan penelitian kimia lebih lanjut (Birch, 1984). Penelitian kimia bahan-bahan yang tak berkhasiat ini mempunyai nilai yang besar bagi bidang-bidang ilmu lainnya misalnya kemotaksonomi, ekologi dan sintesis (Silva dan Kawan-kawan, 1984).

Khusus di bidang sintesis bahan-bahan tidak berkhasiat ini banyak memberikan manfaat. Banyak bahan-bahan berkhasiat yang sintesis gugus intinya memerlukan dana yang sangat besar, sedangkan di alam gugus inti yang diperlukan telah tersedia di dalam tumbuhan itu sendiri. Contoh yang menarik dalam kaitan ini misalnya pembuatan hormon-hormon steroid yang digunakan untuk bahan obat antifertilitas. Sekitar tahun 1930 rumus struktur dan

sifat kimia hormon-hormon steroid telah dapat dimengerti dengan baik serta diketahui pula peranannya dalam siklus reproduksi (Crabbe, 1984). Karena minatnya yang tinggi untuk meneliti sapogenin dan keinginnannya untuk dapat memanfaatkan diosgenin, Marker meneliti 40.000 kg bahan dari 400 jenis tumbuhan yang diambil di daerah Amerika Serikat bagian Selatan dan daerah Mexico. Disekitar tahun 1940 Marker menemukan *Dioscorea macrostachya* yang mengandung banyak diosgenin. Marker telah berhasil membuat progesteron yang jumlahnya dapat mempengaruhi pasaran dunia. Ini merupakan kelahiran dari industri hormon steroid yang menggunakan bahan awal yang berasal dari tumbuhan. Pada awal tahun 1950 Djerassi, Stork dan Kawan-kawan telah melakukan pekerjaan yang hebat pada saat itu, yaitu mengubah diosgenin menjadi kortison, suatu kortikoid yang penting (Crabbe, 1984).

Mengetahui pentingnya peranan diosgenin dalam rangka penyediaan hormon-hormon steroid, di Indonesia telah dilakukan usaha-usaha pembudidayaan *Dioscorea*, *Solanum* dan *Trigonella* yang diharapkan akan dapat memenuhi kebutuhan akan bahan tersebut (Padmawinata dan Soetarno Soediro, 1985).

Saat ini obat oral kontrasepsi yang sangat efektif adalah senyawa-senyawa turunan steroid. Namun seperti halnya dengan obat-obat yang lain, obat ini juga mempunyai efek-efek sampingan. Oleh karenanya pencarian

obat-obat baru antifertilitas yang mempunyai efek sampingan sekecil mungkin terus dilakukan (Suharti K. Suherman, 1985).

Dalam rangka mencari obat antifertilitas yang berasal dari tumbuhan, WHO membentuk suatu Kelompok kerja. Kelompok kerja ini memberikan rekomendasi berdirinya enam pusat penelitian yang merupakan ujung tombak dalam penelitian mencari bahan antifertilitas dari tumbuhan. Keenam pusat penelitian tersebut berada di :

- Chinese University of Hong Kong, Hong Kong
- Natural Products Research Institute, National University Seoul, Korea
- Universidade Federale de Pernambuco, Recife, Brazil
- University of Sri Lanka, Paradeniya, Sri Lanka
- The City University, London , England
- College of Pharmacy, University of Illinois Medical Center, Chicago, Illinois, USA

Pusat-pusat penelitian ini bertugas meneliti di bidang farmakologi dan kimia dari bahan-bahan berkhasiat yang berasal dari tumbuhan. Dalam pelaksanaan program ini Kelompok kerja tersebut telah menyusun daftar yang terdiri dari 3000 tumbuhan yang dikatakan mempunyai aktivitas antifertilitas. Kadang-kadang mekanisme kerja dari tumbuhan yang diinformasikan dalam laporan etnomedikal hanya disimpulkan dari kebiasaan pemakaiannya. Ke-

lompok kerja tersebut juga menyusun urutan prioritas yang didasarkan atas cara pemakaian suatu tumbuhan sebagai obat antifertilitas. Urutan prioritas tumbuhan untuk diteliti adalah sebagai berikut :

- A. Yang digunakan oleh wanita sekali sebulan, menjelang datang bulan.
- B. Yang digunakan oleh laki-laki
- C. Yang digunakan oleh wanita setelah terlambat datang bulan sekali.
- D. Yang digunakan oleh wanita setelah hubungan badan pada pertengahan siklus.
- E. Yang digunakan oleh wanita pada saat hubungan badan.
- F. Yang digunakan oleh laki-laki atau wanita yang tidak dapat dimasukkan dalam urutan prioritas yang lain.
- G. Bahan antifertilitas untuk laki-laki tapi digunakan oleh wanita.
- H. Yang digunakan oleh wanita bila telah terlambat datang bulan lebih dari sekali.
- I. Yang digunakan oleh wanita setelah datang bulan.

Sebagai suatu contoh, bila tumbuhan dalam laporan etno-medikal dikatakan untuk "emmenagogue" maka tumbuhan ini mempunyai prioritas A,C,D,H (Soejarto dan Kawan-kawan, 1978).

Melihat cara penggunaan damar *Avicennia marina* maka tumbuhan ini paling tidak menempati prioritas C untuk diteliti.

2.2. Tinjauan Umum tentang *Avicennia marina*

Avicennia marina merupakan tumbuhan dari hutan pasang atau dari pantai, dengan akar nafas yang tumbuh lurus ke atas. Tumbuhan ini berupa pohon yang tingginya lebih dari 14 m dan kadang-kadang dapat mencapai 23 m, kayunya keras dan agak berat. Bagian kulit kayu berwarna abu-abu pucat, terasnya coklat kehijauan sampai lembayung (Burkill, 1935).

Daun tunggal berhadapan, bertangkai, lamina bentuknya jorong memanjang atau bulat telur terbalik memanjang dengan pangkal yang lancip dan ujung yang tumpul atau bulat. Sisi daun sebelah bawah berwarna putih kehijauan, panjang daun 3 - 9 cm dan lebar 1.25 cm - 4.50 cm. Bunga berwarna kuning, penampang 0,5 cm, berupa bongkol tertekan pada percabangan karangan bunga yang berupa malai. Bongkol terdiri dari 2 - 12 bunga, pasangan bunga bagian bawah kadang-kadang jaraknya jauh dari bunga yang lain, bongkol yang tua panjangnya 0,5 - 1,5 cm, tangkai putik panjangnya 1,5 mm, kepala putik melengkung (Backer dan Bakhuizen, 1965). Buah bergantung dua-dua dan empat bersama-sama, gepeng agak miring dengan puncak kecil pendek dimukanya, diselubungi selaput hijau kelabu se-

perti wol, di bawahnya terdapat dua keping yang melipat memanjang, diselanya duduk akar lembaga seperti suatu rumbai putih (Heyne, 1950).

Kayunya digunakan sebagai kayu bakar. Para nelayan sangat menyenangi kayu bakar ini untuk mengasapi ikan karena dapat memberikan bau yang sedap kepada ikan yang diasapi. Sering pula kayu tumbuhan ini digunakan untuk membuat lumpang padi.

Tidak semua bagian buah dapat dimakan, tetapi hanya bijinya saja. Biji tersebut direbus, direndam semalam, kemudian dibersihkan dari akriditasnya.

Daun dapat digunakan sebagai makanan ternak. Dari kulit batang tumbuhan ini dapat keluar damar yang mempunyai rasa pahit dan berbau khas. Damar ini banyak digunakan sebagai bahan obat. Selain dari yang telah diuraikan terdahulu, damar ini di Arab digunakan sebagai obat sakit gigi dan dikatakan pula mempunyai khasiat afrodisiaka (Burkill, 1935).

2.3. Pemilihan Binatang Percobaan.

Jenis binatang yang digunakan dalam suatu penelitian tergantung kepada jenis penelitian itu sendiri. Untuk penelitian pencarian bahan berkhasiat akan dibutuhkan jumlah binatang yang besar. Dalam hal ini digunakan binatang yang mempunyai ukuran badan yang kecil (Petter, 1971). Untuk penelitian uji aktivitas antifertilitas,



bila dana yang tersedia memungkinkan dan peraturan perlindungan hewan liar membolehkan, dalam penelitian ini digunakan kera sebagai binatang percobaannya. Tikus adalah pilihan yang lain. Sedangkan pada mencit mungkin akan timbul variasi respon antara galur satu dengan lain terhadap obat yang diberikan (Flint, 1985). Laurence dan Bacharach (1964) menggunakan mencit atau tikus dalam penelitian bahan obat antifertilitas. Sedangkan dalam laporan Kelompok Ilmiah WHO disebutkan tikus, mencit dan kelinci sebagai binatang percobaan dalam penelitian teratogenik (WHO Scientific Group, 1967). Untuk penelitian yang sama, Sardjono O Santoso dan Hendra Utama (1983) mengatakan untuk Indonesia paling tepat menggunakan mencit. Hal ini disebabkan biaya pemeliharaan mencit lebih murah dari pada tikus, walaupun mencit mempunyai beberapa kekurangan yaitu fetusnya lebih kecil dan kemampuan resorpsinya relatif tinggi. Dari beberapa alternatif yang diberikan tampak dana merupakan salah satu kriteria yang diperhatikan dalam melakukan pilihan.

Di dalam penelitian ini dipilih mencit sebagai binatang percobaan dengan alasan sebagai berikut :

1. Mencit merupakan salah satu binatang yang dipilih untuk penelitian bahan obat antifertilitas.
2. Memerlukan ekstrak dan isolat yang lebih sedikit.

3. Biaya pemeliharaannya relatif murah.

2.4. Uraian tentang mencit (*Mus musculus*).

Mencit betina mencapai tingkat dewasa setelah berumur 35 - 60 hari dengan berat badan 20 - 35 g. Mencit betina masa reproduksinya berlangsung selama 1 - 1,5 tahun (Hafez, 1970).

Siklus estrus. Mencit termasuk binatang yang poli-estrus. Daur estrus dibedakan menjadi 4 stadium yaitu estrus, metestrus, diestrus dan proestrus. Masing-masing stadium dapat dikenal melalui pemeriksaan oles vagina.

Adanya banyak sel bersisik pada oles vagina merupakan karakteristik stadium estrus, sedangkan adanya leukosit di antara sel-sel bersisik yang makin meningkat sampai hilangnya sel-sel bersisik dan hanya tampak leukosit merupakan karakteristik stadium metestrus. Pada stadium metestrus ini oles vagina akan berupa lendir yang kental. Keadaan ini kemudian berubah dan pada oles vagina hanya tampak sedikit sel. Keadaan seperti ini merupakan karakteristik stadium diestrus. Satu hari sebelum stadium estrus, akan tampak sel-sel berinti berbentuk koma yang memanjang. Tampaknya sel-sel seperti ini merupakan karakteristik stadium proestrus. Daur estrus ini berlangsung selama 4-5 hari (lihat lampiran I).

Melalui pengamatan oles vagina dapat diduga keadaan sistem reproduksi dari mencit betina (lihat lampiran

II). Kalau oles vagina yang dilakukan pada pagi hari pertama menunjukkan adanya sel-sel bersisik menandakan mencit dalam stadium estrus. Ovulasi telah terjadi pada dini hari sebelumnya. Pada keadaan ini uterus membengkak karena adanya cairan uterus. Menjelang malam pada oles vagina akan tampak leukosit dan pada malam harinya badan kuning telah terbentuk sempurna. Hari berikutnya akan tampak lebih banyak leukosit pada oles vagina dan uterus tumbuh untuk mempersiapkan implantasi. Bila tidak terjadi pembuahan uterus akan mengalami regresi. Sementara sejumlah folikel mulai tumbuh, dinding uterus menebal dan menjelang folikel Graaf telah mempunyai antrum sel-sel berinti tampak lagi pada oles vagina. Kopulasi akan terjadi pada periode tiga jam pertama setelah terjadinya birahi. Bila terjadi kebuntingan oles vagina akan menunjukkan keadaan bervariasi dari stadium metestrus sampai diestrus (Cohen, 1977).

Pembentukan sel telur. Urutan stadium perkembangan sel telur adalah :

1. proliferasi oogonium
2. tumbuh dan masaknya oosit
3. pembentukan folikel yang berisi sel telur masak
4. pelepasan sel telur.

Gonosit yang berasal dari endoderm luar embrio mengadakan migrasi kedalam ovarium embrio dan kemudian mengadakan diferensiasi menjadi oogonia. Oogonia akan mengakhiri proliferasinya beberapa hari sebelum kelahiran.

Pertumbuhan oosit ditandai oleh:

1. adanya akumulasi kuning telur di dalam sitoplasma.
2. perkembangan zona pelusida
3. proliferasi mitotik dari epitelium folikel dan jaringan di dekatnya.

Mula-mula sel telur dan folikel tumbuh secara cepat kemudian setelah terbentuk antrum oosit tidak tumbuh lagi tetapi folikel oleh pengaruh hormon hipofisa melanjutkan pertumbuhannya secara cepat. Pemasakan oosit terjadi selama tahap kedua dari pertumbuhan folikel. Inti sel yang memasuki stadium profase dari proses meotik pertama sekarang mengalami meosis. Nukleoli dan selaput inti sel lenyap dan kromosom merapat. Sentrosom terbagi menjadi dua sentriol yang bergerak ke arah kutub yang berlawanan dari sel. Benang gelendong (spindle fibre) tampak menghubungkan sentriol dengan kromosom. Pasangan-pasangan diploid ini bergerak ke arah pusat sel dan menata diri dalam satu bidang, yaitu bidang equator dari gelendong. Kemudian mereka memisah masing-masing satu dari setiap pasangan menuju ke masing-masing kutub sel.

Sebuah selaput terbentuk pada bidang equator dan membagi sel menjadi dua anak sel (Hafez, 1970).

Oosit primer mengalami dua kali proses meotik. Dua anak sel sebagai hasil proses pertama mempunyai setengah (n) komplemen kromosom ($2n$) dari sel induk. Tidak seperti proses meotik pada spermatogenesis, satu dari anak oosit membutuhkan hampir semua sitoplasma dan kemudian disebut oosit sekunder dan yang lain merupakan sel yang lebih kecil menjadi badan kutub (**polar body**) pertama (Hafez, 1970).

Selama proses pemasakan yang kedua, oosit sekunder membagi diri menjadi sebuah ootid (yang mempunyai sejumlah n kromosom) dan badan kutub kedua (juga dengan sejumlah n kromosom). Badan-badan kutub ini dilepaskan ke rongga perivitelin dan mengalami degenerasi (Hafez, 1970).

Proses pemasakan kedua terjadinya tidak bersamaan dengan ovulasi. Oosit dalam stadium pakiten atau diplo-ten dari profase I selama stadium diestrus. Proses meotik pertama terjadi menjelang ovulasi tetapi proses meotik kedua tak sempurna sampai terjadi fertilisasi (Hafez, 1970).

Perkembangan folikel. Pada saat lahir, oogonia telah menjadi folikel primer. Untuk menjadi masak folikel ini berturut-turut mengalami stadium folikel sekunder, tersier dan terakhir folikel Graaf. Folikel primer

ditandai dengan adanya selapis sel-sel granulosa sedangkan yang sekunder ditandai oleh adanya lebih dari satu lapis sel-sel granulosa. Sampai pada stadium folikel sekunder ini perkembangan folikel bebas dari pengaruh hormon. Pada akhir stadium folikel sekunder sel-sel folikel mulai membangun reseptor-reseptor hormon. Sel-sel granulosa membangun reseptor untuk FSH dan estrogen sedangkan sel-sel teka membangun reseptor untuk LH. Folikel membutuhkan hormon ini untuk melanjutkan perkembangannya.

Stadium folikel tersier ditandai dengan telah terbentuknya antrum. Pada stadium ini oosit tetap dalam stadium diktioten. Oosit dikelilingi oleh kumulus ooforus yang dihubungkan oleh lapisan tipis sel-sel granulosa dengan lapisan luar sel-sel granulosa.

Perubahan struktur ini diikuti oleh perubahan aktivitas dimana terjadi peningkatan sintesis androgen dan estrogen. Androgen, yaitu androstenedion dan testosteron diproduksi oleh sel-sel teka interna yang mempunyai reseptor yang secara kuat dirangsang oleh LH. Sintesis estrogen terjadi pada sel-sel granulosa yang dapat mengaromatisasi androgen yang berasal dari sel-sel teka. Sintesis ini dirangsang oleh FSH.

Adanya rangsangan pada reseptor LH di lapisan luar sel-sel granulosa menyebabkan diproduksinya progesteron oleh folikel. Adanya reseptor LH pada sel-sel granulosa sebelah luar menandai akhir stadium folikel tersier.

Banyak folikel yang mencapai stadium ini akan mengalami atresia kecuali bila diselamatkan dengan lonjakan tajam tingkat gonadotropin, terutama LH yang akan membawa folikel ke stadium preovulasi (Hafez, 1970 ; Findlay, 1984).

Ovulasi dan pembentukan badan kuning (corpus luteum).
Selama stadium proestrus banyak folikel mulai tumbuh. Dari folikel-folikel yang tumbuh ini hanya sebagian yang dapat menjadi folikel Graaf sedangkan yang lainnya akan mengalami atretik. Ovulasi terjadi sembilan jam setelah memasuki stadium estrus. Badan kuning tumbuh dari semua folikel-folikel yang telah melepaskan sel telurnya. Empat jam setelah ovulasi dinding folikel mulai melakukan reorganisasi terutama teka internanya. Aktivitas pada sel-sel granulosa tidak tampak paling tidak sampai dua jam kemudian. Stigma akan tertutup 12 jam setelah ovulasi sedangkan pembentukan sel-sel lutein setelah 24 jam. Badan kuning akan terbentuk sempurna dan mencapai ukuran maksimalnya setelah tiga hari.

Bila terjadi kopulasi tetapi tidak terjadi fertilisasi maka badan kuning ini akan mengalami degenerasi sedangkan bila terjadi fertilisasi badan kuning akan terus tumbuh dan berfungsi dalam jangka waktu yang lebih lama. Masing-masing badan kuning ini disebut badan kuning kebuntingan semu dan badan kuning kebuntingan. Badan kuning kebuntingan semu berfungsi selama 12 hari se-

dangkan badan kuning kebuntingan selama 18 hari. Selama berfungsi badan kuning banyak menerima darah. Oleh karenanya badan kuning yang aktif ini akan tampak pada permukaan ovarium sebagai suatu tonjolan yang berwarna merah cerah (Hafez, 1970).

Kopulasi. Mencit termasuk binatang yang hanya melakukan kopulasi pada waktu malam hari. Mencit betina akan mulai birahi pada pukul 16 sampai pukul 22 pada hari dimana oles vagina menunjukkan stadium proestrus. Kopulasi biasanya terjadi pada tahap tiga jam pertama sejak timbulnya birahi. Pada stadium estrus ini cairan vagina diubah oleh estrogen yang mengakibatkan berubahnya substrat metabolik untuk flora vagina; oleh karena itu mengubah produksi asam-asam alifatik yang mudah menguap dan menyebabkan perubahan daya tarik seksual dari mencit betina (Findlay, 1984).

Terjadinya kopulasi ditandai dengan terdapatnya sumbat vagina. Sumbat vagina ini terdapat di antara pukas dan leher rahim dan akan teramati selama 16 sampai 48 jam (Hafez, 1970).

Fertilisasi. Ketika sel telur dilepaskan dari folikel pada saat terjadinya ovulasi, sel telur ini dikelilingi oleh sel-sel kumulus. Spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi telah siap di saluran telur pada saat sel telur menuju bagian ini. Namun demikian biasanya ada waktu istirahat satu sampai satu setengah jam sebelum

sperma mengadakan penetrasi. Kelambatan ini diperlukan untuk pelepasan kumulus yang akan mempermudah sperma melakukan penetrasi. Faktor yang berperan dalam pelepasan ini adalah deteriorasi spontan dari sel-sel granulosa, kemampuan maserasi gerakan otot saluran telur dan pelepasan hialurodinase oleh sperma.

Zona pelusida merupakan lapisan ekstraseluler, tetapi tidak seperti cairan antral, zona pelusida lebih banyak mengandung asam sialat dari pada asam hialuronat. Enzym yang berasal dari sperma mempunyai kemampuan untuk melarutkan zona pelusida. Sperma hanya memerlukan waktu beberapa menit untuk menembus zona pelusida. Setelah memasuki sitoplasma sel telur, sperma secara pelan-pelan diam, bagian kepala mulai membengkak dan melepaskan bagian tengah dan ekor.

Pada saat terjadi penetrasi sel telur dalam stadium metafase proses meotik yang kedua. Beberapa saat setelah berlangsungnya penetrasi, terjadi pembelahan dan badan kutub yang kedua dilepaskan dari sel telur dan kemudian akan terbentuk pronukleus betina. Sementara itu kepala sperma membengkak dan tampak banyak nukleoli dan ini akan menjadi pronukleus jantan. Pada akhir pertumbuhannya kedua pronukleus tersebut mengambil posisi berdampingan. Setelah beberapa saat kedua pronukleus mengecil dan nukleoli bersatu kemudian lenyap. Pada akhir stadium profase ini dan pada permulaan stadium metafase, dua

rumpun kromosom terpisah. Pada akhir stadium metafase semua kromosom terorganisasikan dalam satu bidang equatorial. Stadium ini merupakan akhir dari singami dan fertilisasi (Hafez, 1970).

Sigaran (Cleavage). Sigaran zigot berlangsung relatif lambat. Sigaran ini menghasilkan sel-sel yang lebih kecil dan tidak diikuti dengan kenaikan masa seperti yang biasa terjadi pada pembelahan sel-sel lainnya. Sel-sel stadium dua sel, empat sel, delapan sel, morula dan blastosista mempunyai bentuk yang lebih kecil dari sel telur asalnya.

Sel stadium dua sel terbentuk pada hari kedua, stadium empat sel pada awal hari ketiga, stadium 16 sel pada akhir hari ketiga dan blastosista pada awal hari keempat terhitung sejak terjadinya kopulasi. Telur yang telah dibuahi akan mencapai uterus setelah 72 jam dalam stadium morulanya (lihat lampiran III) (Hafez, 1970).

Implantasi. Implantasi adalah pengikatan blastosista pada endometrium uterus. Syarat pertama agar terjadi pengikatan ini adalah aposisi blastosista pada epitelium uterus. Stadium selanjutnya adalah adesi blastosista uterus. Aposisi jelas disebabkan oleh membengkaknya endometrium yang kemudian menekan epitelium disekeliling blastosista dan menggapitnya. Adesi antara trofoblas blastosista dengan epitelium endometrium baru terjadi sekitar 12 sampai 24 jam kemudian. Implantasi ini terja-

di pada hari kelima terhitung sejak terjadinya kopulasi. Untuk terjadinya implantasi uterus membutuhkan kondisi tertentu yaitu kondisi yang tercipta karena stimulasi progesteron dalam tingkat tertentu (Hafez, 1970).

Mekanisme antifertilitas pada binatang percobaan. Banyak tempat di dalam tubuh binatang betina dimana suatu zat yang mempunyai khasiat antifertilitas dapat menunjukkan aktivitasnya. Tempat-tempat ini adalah hipotalamus, anterior hipofisa, ovarium, saluran telur, uterus (termasuk endometrium, miometrium dan leher rahim) dan vagina. Suatu zat mungkin menunjukkan aktivitasnya di beberapa tempat dan mungkin dengan mekanisme yang berbeda. Sebaliknya mungkin zat yang berbeda mempunyai aktivitas di tempat yang sama tetapi dengan mekanisme yang berlainan.

Perlu diketahui adanya penggolongan binatang yang berdasarkan terjadinya ovulasi yaitu :

Ovulator spontan. Hormon folikulotropik (FSH dan LH) merangsang pertumbuhan folikel dan sekresi estrogen. Estrogen memberikan umpan balik kepada poros hipotalamus-hipofisa bahwa folikel telah masak. Estrogen juga berfungsi merangsang lonjakan LH. Lonjakan LH mengakibatkan sekresi progesteron yang pada akhirnya menimbulkan birahi. Binatang yang termasuk golongan ini antara lain mencit, tikus dan anjing (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975).



Ovulator terinduksi. Seperti halnya pada binatang ovulator spontan, pada binatang ovulator terinduksi hormon folikulotropik juga merangsang pertumbuhan folikel dan sekresi estrogen. Akan tetapi di samping memberikan signal kepada poros hipotalamushipofisa bahwa folikel telah masak estrogen juga menginduksi kebirahian dan kepekaan hipotalamus terhadap rangsangan kopulasi yang akhirnya merangsang lonjakan LH. Lonjakan LH merangsang sekresi progesteron dan terjadinya ovulasi. Binatang yang termasuk dalam golongan ini misalnya kucing dan kelinci (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975).

Penggolongan mekanisme antifertilitas. Berdasarkan tempat di mana terjadinya aktivitas, maka mekanisme antifertilitas dapat digolongkan sebagai berikut :

Hipotalamus-hipofisa. Dua daerah ini dijadikan satu karena dua alasan :

1. berfungsinya hipofisa adalah di bawah kontrol yang ketat dari hipotalamus.
2. apakah suatu zat berfungsi pada hipotalamus atau hipofisa merupakan hal yang kontroferensial.

Dengan demikian di daerah ini dapat dibedakan dua macam mekanisme yaitu:

1. menghentikan fungsi humoral dan hormonal yang normal dari hipotalamus dan/atau hipofisa, misalnya dengan steroid, zat nonsteroid yang mempunyai aktivitas antigonadotropin.

Mekanisme : estrogen dan progesteron dibutuhkan untuk birahi yang normal pada binatang ovulator spontan sedangkan untuk yang ovulator terinduksi hanya dibutuhkan estrogen. Zat yang secara langsung menghambat sekresi gonadotropin akan secara tidak langsung menghambat sekresi ovarium. Sedangkan zat yang tidak mempunyai aktivitas estrogenik dan atau progestogenik bila diberikan kepada binatang akan mengakibatkan binatang tersebut tetap dapat menunjukkan birahi. Lebih lanjut bila yang diberikan zat estrogen antagonik maka akan jelas menghambat umpan balik estrogen pada hipotalamus yang dibutuhkan untuk lonjakan LH dan juga mencegah terjadinya birahi.

2. menghentikan masukan neural ke hipotalamus misalnya dari lingkungan dan waktu yang mengatur sekresi GnRH pada ovulator spontan.

Mekanisme : oleh karena hipotalamus adalah

subyek masukan neural dari daerah-daerah lainnya di dalam otak, zat-zat yang mempunyai aktivitas menekan susunan syaraf pusat dan /atau efek pada transmisi neurohumoral dapat mempengaruhi sekresi gonadotropin. Melihat hal tersebut dapat dikatakan bahwa zat-zat yang mempengaruhi sekresi gonadotropin akan mempunyai efek antifertilitas sesudah ovulasi. Sekresi estrogen dan/atau progesteron yang dibutuhkan untuk implantasi diatur oleh hipofisa. Fungsi luteal juga tetap di bawah pengaturan langsung dari hipofisa selama setengah periode kebuntingan (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975).

Ovarium : Zat antifertilitas mungkin menunjukkan aktivitas di ovarium dengan menghambat terjadinya ovulasi dan/atau menghambat steroidogenesis. Walaupun mekanisme intraovarium yang menyebabkan terjadinya ovulasi belum jelas, tampaknya sintesis proteina terlibat di dalamnya. Percobaan-percobaan menunjukkan bahwa obat-obat kontrasepsi steroid dapat menunjukkan aktivitasnya langsung di ovarium untuk menghambat ovulasi dan/atau beberapa segi steroidogenesis. Steroidogenesis sendiri terlibat dalam proses ovulasi. Obat-obat yang mempunyai akti-

vitamin menghambat steroidogenesis dalam ovarium terutama pada fungsi luteal mempunyai kemampuan untuk mencegah berlanjutnya kebuntingan bila diberikan pada awal kebuntingan itu sendiri (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975).

Saluran telur : Karena implantasi yang normal tergantung kepada ketepatan waktu tibanya blastosista di uterus, gangguan transportasi pada saluran telur akan dapat diikuti oleh kegagalan implantasi. Oleh karena itu zat-zat yang mempunyai aktivitas untuk mempengaruhi motilitas saluran telur mempunyai kemampuan untuk menghambat fertilitas. Sel-sel telur yang telah dibuahi akan mengalami degenerasi bila tiba di uterus terlalu dini. Ketidakmampuan hidup sel telur tersebut di dalam uterus inilah yang mengakibatkan hilangnya fertilitas. Hilangnya fertilitas ini diperkirakan oleh keadaan uterus dan bukan oleh kecepatan transportasi sel telur itu sendiri.

Uterus : Zat-zat antifertilitas yang mencegah terjadinya ovulasi dan atau fertilisasi digolongkan sebagai zat kontrasepsi. Sedangkan zat yang bekerja setelah terjadinya implantasi digolongkan sebagai abortivum. Istilah intersepsi digunakan untuk zat-zat yang bekerja

setelah terjadinya fertilisasi untuk mencegah terjadinya implantasi. Dengan definisi ini berarti bahwa zat-zat yang mempengaruhi jumlah sekresi steroid yang dibutuhkan selama jangka waktu tersebut baik yang berpengaruh langsung di ovarium atau secara tidak langsung dengan menghambat sekresi gonadotropin atau prolaktin dapat digolongkan sebagai intersepsi. Zat-zat yang dapat digolongkan dalam golongan ini antara lain zat yang dapat mencegah pertumbuhan sel telur yang telah dibuahi, yang menghambat perkembangan tropoblas, motilitas uterus sehingga implantasi tidak terjadi.

Vagina : Preparat-preparat spermisidal digunakan sebagai bahan antifertilitas melalui vagina (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975).

2.5. Tinjauan metode uji antifertilitas.

Farnsworth dan Kawan-kawan (1975) memberikan garis besar cara uji antifertilitas baik untuk mengetahui aktivitas sebagai kontrasepsi, intersepsi maupun sebagai abortivum. Farnsworth dan Kawan-kawan tidak menyertakan kriteria statistik yang dapat digunakan untuk mengukur hasil yang diperoleh. Metode Lie dan Chi (1985) memberikan cara uji antifertilitas yang lebih rinci disertai dengan kriteria yang digunakan untuk mengukur hasil.

Namun metode Lee dan Chi tidak mencantumkan metode untuk menguji aktivitas kontrasepsi dari sediaan. Menurut metode Farnsworth dan Kawan-kawan pembedahan tikus dilakukan pada H-20 sedangkan metode Lee dan Chi dilakukan pada H-16. Pembedahan pada H-20 mempunyai beberapa kelemahan yaitu :

- pembedahan terlalu dekat dengan waktu kelahiran (mencit masa kebuntingannya 17 - 21 hari dan tikus 20 - 22 hari (Hafez, 1970)) Hal ini mengkhawatirkan terutama bila yang digunakan sebagai binatang percobaan adalah mencit.
- pembedahan pada H-20 akan menyukarkan penghitungan badan kuning. Badan kuning kebuntingan aktif selama 18 hari dan dalam keadaan aktif, badan kuning tampak jelas sebagai tonjolan merah terang pada permukaan ovarium (Hafez, 1970). Kesulitan penghitungan badan kuning ini terutama bila binatang percobaan yang digunakan adalah mencit.

Untuk uji aktivitas sebagai kontrasepsi Farnsworth dan Kawan-kawan tidak menyebutkan lama mencit betina dan jantan dikumpulkan. Menurut Laurence dan Bacharach (1964) suatu koloni yang baik bila jantan dan betina dewasa dikumpulkan, dalam waktu paling lambat tujuh hari akan telah melakukan kopulasi.

Dalam penelitian ini dilakukan empat macam uji antifertilitas yaitu :

1. Uji aktivitas antifertilitas I : Untuk mengetahui aktivitas kontrasepsi dari bahan. Untuk uji ini digunakan kombinasi metode Farnsworth dan Kawan-kawan, Lee dan Chi serta metode Laurence dan Bacharach.
2. Uji aktivitas antifertilitas Iia : Untuk mengetahui aktivitas intersepsi. Digunakan metode Lee dan Chi yang dimodifikasi.
3. Uji aktivitas antifertilitas Iib : Untuk mengetahui aktivitas bahan pada awal stadium implantasi. Digunakan metode Lee dan Chi yang dimodifikasi.
4. Uji aktivitas antifertilitas Iic : Untuk mengetahui aktivitas bahan sejak awal stadium sigaran sampai dengan awal stadium implantasi. Digunakan metode Lee dan Chi yang dimodifikasi.

Jumlah cairan yang diberikan kepada binatang percobaan digunakan aturan yang diberikan oleh Ritschel (1974).

2.6. Tinjauan cara evaluasi hasil uji aktivitas antifertilitas

Lee dan Chi (1985) membuat urutan prioritas dalam menilai hasil uji aktivitas antifertilitas yaitu :

1. Prioritas tingkat A : penilaian berdasarkan perbandingan laju kebuntingan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.
2. Prioritas tingkat B : penilaian berdasarkan prosentase pengurangan jumlah tapak implantasi (implantation site)
3. Prioritas tingkat C : penilaian berdasarkan prosentase jumlah fetus.
4. Prioritas tingkat D : penilaian berdasarkan prosentase pengurangan jumlah badan kuning.

Penilaian masing-masing tingkat dibagi menjadi tiga kategori yaitu positif, medium dan negatif (lihat halaman 52).

Penilaian prioritas tingkat A yang diberikan oleh Lee dan Chi sesuai dengan uji Chi kwadrat, $p < 0,05$.

Berdasarkan variabel yang diukur dan rancangan penelitian yang digunakan, prioritas tingkat B,C dan D dapat diuji dengan "Student t". Berlainan dengan cara yang biasa dilakukan dalam perhitungan statistik, Lee dan Chi menghitung jumlah rata-rata fetus, tapak implantasi dan badan kuning hanya dari anggota kelompok yang bunting. Dengan demikian kriteria yang diberikan oleh Lee dan Chi

untuk kategori positif lebih ketat. Cara perhitungan jumlah rata-rata menurut Lee dan Chi ini sangat penting, terutama untuk penilaian prioritas tingkat D karena badan kuning mencit yang bunting mempunyai kondisi yang berbeda dengan yang tidak bunting.

Berdasarkan uraian diatas maka hasil uji aktivitas anti-fertilitas dalam penelitian ini dinilai berdasarkan kriteria Lee dan Chi.

2.7. Uraian tentang senyawa triterpena

Di dalam tumbuh-tumbuhan senyawa triterpena terdapat di dalam buah, daun, kulit batang, damar dan di dalam getah. Triterpena tertentu dapat dikenal karena rasanya yang pahit seperti misalnya limonin dan kukurbitasin (Harborne, 1973).

Senyawa triterpena merupakan senyawa yang mempunyai rantai karbon berupa enam unit isoprena yang merupakan hasil biosintesis hidrokarbon asiklik squalena. Senyawa-senyawa ini mempunyai struktur siklik yang relatif kompleks dan sebagian besar merupakan senyawa alkohol, aldehida atau asam karboksilat (Harborne, 1973; Pine, 1981).

Senyawa triterpena merupakan kristal tak berwarna, mempunyai titik lebur yang tinggi dan mempunyai sifat keaktifan optik. Karena reaktifitasnya yang rendah senyawa-senyawa ini sulit dikarakterisasi. Uji yang sangat

luas digunakan untuk mengetahui adanya senyawa ini adalah reaksi Liebermann-Burchard (Santos dan Kawan-kawan, 1978).

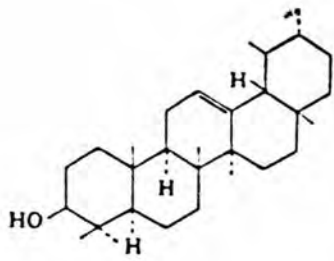
Diketahui adanya senyawa-senyawa triterpena yang dapat menghentikan pembelahan sel telur dan menghambat perkembangan blastosista landak laut (Das dan Shashi, 1983).

Senyawa saponin. Di dalam tumbuhan selain sebagai senyawa bebas triterpena dapat pula terdapat sebagai senyawa yang terikat yaitu sebagai saponin. Adanya saponin ini dapat ditandai dengan timbulnya buih yang stabil bila larutannya dalam air dikocok (Santos dan Kawan-kawan, 1978).

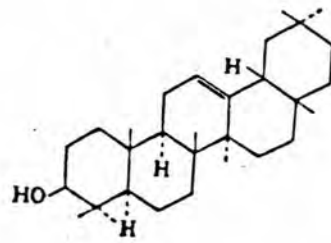
Tidak kurang dari 500 jenis tumbuhan dari 90 suku diketahui mengandung saponin termasuk di dalamnya tumbuhan dari keluarga Verbenaceae. Di dalam tumbuhan bisa terdapat dalam akar, biji, batang dan bahkan mungkin pada seluruh bagian suatu tumbuhan (Basu dan Rastogi, 1967; Chandel dan Rastogi, 1980).

Saponin yang geninnya merupakan senyawa triterpena umumnya terdapat di dalam tumbuhan Dicotyledoneae (Trease, 1978). Saponin ini merupakan bagian yang terbesar dari saponin yang terdapat di alam. Sapogenin dari saponin ini kebanyakan berupa senyawa triterpena pentasiklik yang mengikat unit gula dan atau asam uronat melalui atom C nomer tiga.

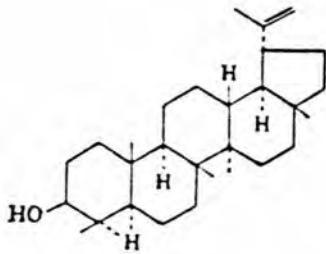
Berdasarkan sapogeninnya saponin ini dibedakan menjadi tiga golongan yaitu golongan α -amirin, β -amirin dan lupeol. Asam oleanolat merupakan sapogenin yang paling banyak ditemui pada saponin golongan β -amirin sedangkan asam kuinovat dan asam asiatat merupakan sapogenin yang banyak ditemui pada saponin golongan α -amirin. Saponin dengan sapogenin golongan lupeol sangat jarang ditemukan di alam (Basu dan Rastogi, 1967; Trease, 1978).



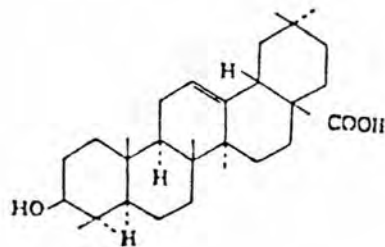
I



II



III

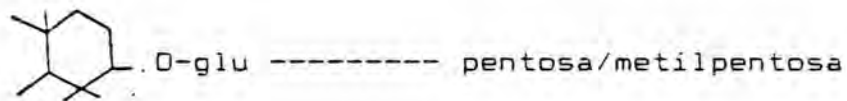


IV

Gambar 1. Rumus struktur α amirin (I), β - amirin (II) lupeol (III) dan asam oleanolat (IV)

Unit gula yang banyak terlibat dalam ikatan glikosida ini adalah adalah D-glukosa, D-galaktosa, D-xilosa, asam D-glukuronat, asam D-galakturonat, L-fukosa, L-ara-binosa dan L-ramnosa. Bila dalam susunan gula tersebut terdapat pentosa atau metil pentosa maka biasanya gula ini terletak di rantai yang sebelah luar (Basu dan Rastogi, 1967).

Diketahui adanya saponin yang dapat menghambat perkembangan dari sel telur dan blastosista (Das dan Shashi, 1983).



Gambar 2. Pentosa/metilpentosa pada bagian luar rantai glukosida

2.8. Pemilihan pelarut dan metode ekstraksi.

Persoalan pertama yang dihadapi dalam melakukan ekstraksi bahan berkhasiat dari tumbuhan agar didapat bahan berkhasiat dalam jumlah maksimal dan tidak terjadi reaksi-reaksi kimia yang tidak diinginkan adalah memilih pelarut dan metode ekstraksi yang tepat. Untuk menarik semua kandungan dalam bahan tumbuhan dapat dilakukan

ekstraksi menggunakan etanol 80% yang disertai pemanasan (Fong dan Kawan-kawan, -). Ekstraksi yang dilakukan dengan pemanasan yang juga disertai adanya air dapat mengakibatkan terbentuknya produk-produk artefak yang terjadi karena adanya peruraian atau perubahan kimia selama proses ekstraksi berjalan (Sutarjadi, 1980). Metanol mempunyai polaritas yang besarnya berada diantara polaritas air dan etanol (Roberts dan Kawan-kawan, 1979). Dengan demikian dapat diharapkan ekstraksi dengan metanol juga akan dapat menarik semua kandungan yang ada dalam bahan tumbuhan. Kong (1978) memberikan pilihan antara metanol atau etanol 70% sebagai bahan pelarut dalam mengekstraksi bahan berkhasiat dari tumbuhan.

Ekstraksi senyawa triterpena dilakukan, pertama menghilangkan lemak yang terkandung dalam bahan tumbuhannya dengan eter, kemudian diikuti ekstraksi dengan metanol dalam keadaan panas (Harborne, 1973). Kalau dikaitkan dengan kandungan yang lain selain triterpena, metode ini mempunyai kelemahan yaitu dilakukan dengan pemanasan dan kemungkinan ada kandungan yang lain ikut tertarik pada waktu penghilangan lemak dengan eter. Nakano dan Suarez (1970) melakukan ekstraksi tiga kali terhadap 14,5 kg bahan tumbuhan dengan 40 l metanol dingin.

Di dalam penelitian ini digunakan metode **Nakano dan Suarez** yang dimodifikasi dengan alasan :

1. Metanol dapat menarik semua bahan berkhasiat dalam tumbuhan.
2. Ekstraksi dilakukan tanpa pemanasan sehingga dapat dicegah kemungkinan terjadinya reaksi kimia yang tidak diinginkan.
3. Tidak dilakukan penghilangan lemak yang memungkinkan ikut hilangnya zat-zat lain selain lemak.

2.9. Uraian tentang pemisahan dan pemurnian dan identifikasi.

Harborne (1973) secara umum menyatakan bahwa berbagai senyawa triterpena dipisahkan dengan cara yang sama, terutama berdasarkan data kromatografi lapisan tipis dan kromatografi gas.

Nakano dan Suarez (1970) memisahkan senyawa triterpena atas dasar sifat asam/basa yang direaksikan dengan beberapa pereaksi. Cara ini ada kelemahannya yaitu kemungkinan terjadi perubahan-perubahan kimia yang tidak diinginkan terhadap komponen-komponen yang lain. **Morris dan Kawan-kawan (1961)**, **Sheth dan Kawan-kawan (1972)**, **Chandel dan Rastogi (1980)**, **Konoshima dan Kawan-kawan (1981)**, **Noor Cholies (1982)** menggunakan arang aktif untuk menghilangkan zat-zat yang berwarna. Ikut terbawa-

nya sebagian zat aktif terutama bila zat aktif tersebut berwarna merupakan kelemahan dari metode menggunakan arang aktif. Pemisahan dengan jalan kromatografi umum dilakukan oleh para peneliti misalnya Chandel dan Rastogi (1980), Gunasekera dan Kawan-kawan (1983).

Pemurnian dilakukan dengan kristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai dan identifikasi isolat-isolat yang didapat dilakukan dengan uji fisiko-kimia seperti spektroskopi massa, infra merah, RMI ^1H . Dilakukan pula uji titik lebur, kromatografi lapisan tipis dan kromatografi kertas.