

1. SPERMATOGENESIS

a. PLANT IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

KIK

TKR 02/01

Sar

P

TESIS

**PERAN EKSTRAK *Phyllanthus niruri* L
TERHADAP
PROSES SPERMATOGENESIS MENCIT (*Mus musculus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RIYANTONO SARNO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**PERAN EKSTRAK *Phyllanthus niruri* L
TERHADAP
PROSES SPERMATOGENESIS MENCIT (*Mus musculus*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



TESIS

Untuk memperoleh gelar magister
dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

RIYANTONO SARNO

NIM 099813088/ M

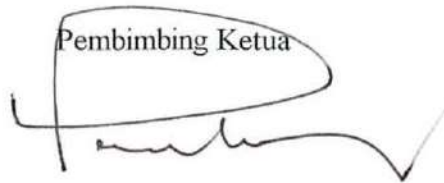
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 7 September 2000

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 19 AGUSTUS 2000

Oleh

Pembimbing Ketua


Prof. Dr.H. Soehartojo H., drh., M.Sc.
NIP. 130 189 851

Pembimbing

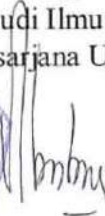


Dr.Drs. Suprpto Ma'at, M.S.,apt.
NIP. 080 030 365

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga




dr. Aucky Hinting, Ph.D.
NIP. 130 873 509

Telah diuji pada
Tanggal 7 September 2000
PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : dr. Aucky Hinting, Ph.D.

Anggota : 1. Prof. Dr.H. Soehartojo H., drh., M.Sc
2. Dr.Drs. Suprpto Ma'at, M.S.,apt.
3. Dra. Hj. Mariatoen Loegito, M.Sc.
4. dr. M. Cholil Munif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala Rakhmat dan Karunia-Nya sehingga tesis ini dapat saya selesaikan dengan tepat waktu.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Bapak Prof. Dr.H. Soehartojo H., drh., M.Sc, selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian, kesabaran, kecermatan, dan dengan antusias telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sehingga tesis ini dapat saya selesaikan.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Bapak Dr.Drs. Suprpto Ma'at, M.S.,apt.,selaku pembimbing yang dengan tekun dan penuh perhatian telah memberikan arahan untuk kebaikan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Bapak dr. M. Cholil Munif yang dengan cermat memberikan arahan metodologi penelitiannya.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Bapak dr.Aucky Hinting Ph.D. yang telah memberikan masukan dan saran serta nasihat yang sangat berguna untuk suksesnya tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang tulus saya sampaikan kepada Ibu Dra. Hj. Mariatoen Loegito Msc. atas saran dan nasihatnya demi kebaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof.H. Soedarto, dr, DTMH, PhD. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang sampai pada akhir pendidikan dijabat oleh Prof.Dr.Soedijono,dr., yang kemudian dijabat oleh Prof. Dr. Muhammad Amin dr.,Sp.P., atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Serta staf administrasi yang telah membantu lancarnya perkuliahan dan urusan administrasi.

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh dr. Aucky Hinting PhD. atas kesempatan dan fasilitas yang saya peroleh mulai masuk sampai selesainya pogram Magister ini.

Para Dosen Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas segala dedikasi dan jerih payahnya telah menstransfer ilmunya yang membuahkan hasil sangat bermanfaat pada penulisan tesis ini.

Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang hingga pertengahan dijabat oleh almarhum Bapak Prof. Dr.dr. Koentjoro Soehadi Msc. Sp.And., yang kemudian dijabat oleh Bapak Drs. Soeharno H., MS.beserta staf yang telah banyak membantu dalam sarana perkuliahan dan nasihatnya.

Kepada Bapak dr. Faroek Hoesin, DsPA. di Laboratorium Pathologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah membantu dalam sarana pembuatan sediaan histologi.

Kepada Ibu Dra. Alfiyah Hayati M.Kes. di Laboratorium Biologi Reproduksi Fakultas MIPA Universitas Airlangga yang telah membantu dan memberikan saran pada proses pengumpulan data .

Kepada staf Laboratorium RS.Petrokimia Gresik atas fasilitas yang telah membantu proses pengumpulan data penimbangan

Kepada teman sejawat di RS.Petrokima atas bantuannya selama saya menyelesaikan program Magister ini.

Kepada teman kuliah seangkatan, dr. Siti Farida dan drh.Hermin Ratnani atas kerja sama dan dorongan serta saran-sarannya.

Saya sampaikan permohonan maaf yang tulus kepada Ibu Sarno, Istriku Wawid dan anak-anak tersayang Arin, Ando dan Ovik, yang sering tersita waktunya dan dengan sabar telah memberikan dorongan dan motivasi sehingga tesis ini bisa selesai tepat waktu.

Semoga tulisan ini berguna bagi yang memerlukan dan seperti kata pepatah bahwa tak ada gading yang tak retak, maka tesis ini pun masih jauh dari sempurna.

Penulis,

dr. Riyantono Sarno

RINGKASAN

Ekstrak *Phyllanthus niruri* L, suatu tanaman obat telah banyak digunakan sebagai imunostimulator untuk penyakit - penyakit yang memerlukan manipulasi sistem imun, penggunaannya dalam jangka panjang. Tetapi sampai saat ini belum diketahui efek tanaman obat ini terhadap organ reproduksi khususnya pada pria.

Phyllanthus niruri L ini merangsang aktivitas monosit/ makrofag serta sel-sel imunogenik untuk mensekresi sitokin, penelitian terdahulu tentang pengaruh sitokin terhadap proses spermatogenesis masih berbeda-beda, ada yang merangsang, ada yang menghambat dan ada penelitian yang menyebutnya tidak berefek, yang berefek terhadap spermatogenesis adalah aktivitas dari monosit/ makrofag intratestikular.

Seperti diketahui bahwa organ terpenting pada sistem reproduksi pria adalah testis, sehingga bila ingin mempelajari pengaruh ekstrak tanaman obat ini terhadap sistem reproduksi pria, lebih diutamakan bila kita meneliti testis dengan segala aspeknya baik sel-sel intratestikular, hormonal maupun pengaruh dari poros hipotalamus - hipofise - testis serta sistem imun tubuh yang dipelajari pada penelitian ini. de Kretser (1995), Perubahan kadar testosteron akan mengakibatkan perubahan spermatogenesis.

Berdasarkan landasan teori, empiris dan penelitian terdahulu bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* L ini merangsang sel Limfosit Th-1 untuk mensekresi TNF- α , dan meningkatkan aktivitas monosit/makrofag.(Ma'at 1997). Aktivitas monosit /makrofag dalam memfagositosis badan residu akan memicu sel Sertoli untuk mensekresi IL-1

yang secara autokrin merangsang spermatogenesis (Wang et al., 1998). TNF- α akan merangsang monosit/ makrofag dan sel-sel lain untuk mensekresi IL-1, IL-6 dan TNF- α itu sendiri (Ma'at, 1997). IL-1 terutama pengaruhnya pada proliferasi sel selama spermatogenesis berlangsung (Khan et al., 1987). TNF- α dan IL-1 akan mempengaruhi testis melalui makrofag atau langsung pada sel Leydig, akan meningkatkan sekresi testosteron (Dwight et al., 1990) dan pada sel Sertoli akan meningkatkan produksi asam laktat sebagai energi metabolik yang penting untuk pertumbuhan sel germinal (Nehar et al., 1997) Sehingga dapat disimpulkan bahwa TNF- α berperan penting sekali pada fungsi testis seperti spermatogenesis disamping pengaturan proses steroidogenesis dan interaksinya dengan sistem imun. (Behnamed, 1997). Basal produksi GM-CSF meningkat 8 kali lipat pada makrofag intratestikular dibanding dengan makrofag dari peritonium pada reaksi inflamasi, dan IL-1, IL-6 dan TNF- α sama kadarnya pada kedua jenis makrofag. Ini mendasari pemikiran khusus tentang status khusus imunologi testis. (Kern et al., 1995). Spermatogenesis pada saat infeksi genetalia tidak terganggu, didapatkan kadar sitokin yang meningkat hanya pada glandula asesori (Huleihel et al 1996).

Belum pernah dilakukan penelitian peran ekstrak tanaman ini terhadap spermatogenesis baik pada manusia maupun pada hewan.

Hipotesis penelitian ini adalah pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada mencit jantan (*Mus musculus*) selama 54 hari dengan beberapa dosis akan meningkatkan berat testis, meningkatkan jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid, juga meningkatkan ukuran diameter dan tebal tubulus seminiferus.

Penelitian ini merupakan jenis eksperimental laboratoris dengan rancangan *randomised the post test only control group design* dengan derajat kemaknaan 0,05. Penelitian ini menggunakan mencit jantan galur Balb/c umur \pm 2 bulan (sexual mature) dengan berat badan 22 -25 gram sebanyak 28 ekor yang dibagi masing - masing 7 ekor tiap kelompok, tehnik pengambilan sampel dengan metode simple random sampling. Kelompok kontrol diberikan per-oral 0,1 ml garam fisiologis, kelompok perlakuan-1 diberikan per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L 2mg/ 0,1 ml, kelompok perlakuan-2 diberikan 4mg/ 0,1 ml dan kelompok perlakuan-3 diberikan 8mg/ 0,1 ml. Tempat penelitian di RS.Petrokimia Gresik, Laboratorium pathologi FK.UNAIR dan Laboratorium biologi reproduksi FMIPA.UNAIR.

Variabel penelitian ini meliputi (a) variabel tergantung yaitu berat testis, , ukuran diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus jumlah sel spermatosit primer, dan jumlah sel spermatid. Semuanya menggunakan skala rasio; (b)variabel bebas adalah dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L variabel bebas adalah dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (c)variabel kendali adalah Jenis ekstrak *Phyllanthus niruri* L, species mencit, jenis kelamin, makanan, minuman, kandang, perawatan, cara membuat sediaan serta cara-cara pengukuran; (d)variabel moderator adalah berat badan mencit

Prosedur pengukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus dengan cara Lothar W, prosedur pengukuran jumlah spermatosit primer dan spermatid dengan Abercrombie's formula yang dikoreksi dengan Sertoli correcting factor.

Analisis data, tiap-tiap kelompok diuji secara deskriptif, normalitas dan uji Anova satu arah, pada derajat kemaknaan 0,05, bila bermakna dilanjutkan dengan BNT, untuk melihat kecenderungan dengan uji regresi, Variabel moderator diuji dengan uji korelasi.

Sebelum dan pada akhir penelitian mencit ditimbang berat badannya. Berdasarkan uji korelasi berat badan tersebut bukan merupakan variabel pengganggu. Kemudian mencit dikorbankan untuk ditimbang berat testis kiri dan kanan. Analisis Anova satu arah menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L tidak bermakna terhadap berat testis kanan karena p hitungan lebih besar dari 0,05, tetapi bermakna pada berat testis kiri.

Pada pengamatan histologi yang diwakili oleh diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta Jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid semuanya menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna pada derajat kemaknaan 0,05.

Disimpulkan bahwa pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada dosis 2,4 dan 8 mg/ 0,1 ml selama 54 hari pada mencit jantan (*Mus musculus*) meningkatkan spermatogenesis yang diwakili oleh berat testis kiri, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah spermatosit primer terkoreksi dan jumlah spermatid terkoreksi.

Saran : perlunya diteliti lebih lanjut tentang aktivitas monosit/ makrofag dan kadar testosteron intratestikular, infertilitas karena gangguan spermatogenesis dan efek sampingnya serta penelitian mengenai daya tahan tubuh karena perbaikan respon imun pada penggunaan ekstrak tanaman ini.

THE ROLE OF *Phyllanthus niruri* L-EXTRACT ON SPERMATOGENESIS OF MICE (*Mus musculus*)

As the use of traditional drugs increases in recent years, herbal extract of *Phyllanthus niruri* L has been recognized as immunostimulator. *Phyllanthus niruri* L-extract stimulates Lymphocyte TH-1 subset to produces TNF- α . TNF- α , in turn, activates macrophage cell to secrete IL-1, IL-6 as well as TNF - α itself.

Previous research has revealed that macrophage cell secrete several factors which either stimulate, inhibit or have no effect on testosterone production by Leydig cell. However, no research has been conducted to evaluate the role of *Phyllanthus niruri* L extract on spermatogenesis of both human and animal. Considering the increasing use of the extract, a research looking at this problem will be worth rewarding.

The hypothesis of this study is that various dosages of extract *Phyllanthus niruri* L will cause the increasing of spermatogenesis of male mice (*Mus musculus*).

The design of this study is "Randomized post test only control group" design. Twenty-eight male mice that were divided into 4 groups were used in the study. They given various dosages of extract *Phyllanthus niruri* L (0,2,4,8 mg/0.1ml) per oral daily for 54 days (one and a half spermatogenesis cycle).

Morphometric analysis of testicles of the mice was conducted to evaluate histologic parameters, which were used to assess the role of extract of *Phyllanthus niruri* L on mouse spermatogenesis.

The experiment revealed that after 54 days of treatment, there were some statistically significant differences on the mean of left weight of the testicle, diameter of seminiferous tube, the thickness of the germinal epithelium, the number of correcting primary spermatocyte, and the number of correcting spermatid between treated group compare to control group ($p = 0.005$), but there are not any significant difference on the right weight of the testicle.

It was concluded that *Phyllanthus niruri* L extract treatment stimulated spermatogenesis of mice (*Mus musculus*)

Key words: *Phyllanthus niruri* L, Spermatogenesis, TNF- α , macrophage

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul depan	i
Sampul dalam	ii
Prasyarat gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan panitia	v
Ucapan terima kasih.....	vi-viii
Ringkasan	ix-xii
Abstract	xiii
DAFTAR ISI	xiv-xvi
DAFTAR TABEL	xvii-xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx-xxi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan masalah	6
1.3 Tujuan penelitian	6
1.4 Manfaat penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Organ reproduksi mencit jantan	8
2.1.1 Histologi testis	8
2.1.2 Struktur tubulus seminiferus	10
2.2 Poros Hipotalamus – Hipofise – Testis.....	18
2.3 Spermatogenesis	22
2.3.1 Spermatisit primer	25
2.3.2 Spermatid	28
2.4 Steroidogenesis	29
2.5 Sistem imun tubuh	32
2.5.1 Sel - sel fagosit	35
2.5.2 Sitokin	37
2.6 Sistem imun pada mencit	40
2.7 Imunomodulator	43
2.8 Tinjauan tentang tanaman ekstrak <i>Phyllanthus niruri L</i>	44
2.8.1 Klasifikasi	44
2.8.2 Nama daerah	45
2.8.3 Pertelaan/ Morfologi	45
2.8.4 Kegunaan tanaman	46
2.8.5 Kandungan tanaman/ isi simplisia	46
2.8.6 Efek imunostimulator <i>Phyllanthus niruri L</i>	47
2.8.7 Pengaruh <i>Phyllanthus niruri L</i> pada proses spermatogenesis dan steroidogenesis	47

BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	49
3.1	Landasan teori	49
3.2	Kerangka konseptual	52
3.3	Hipotesis penelitian yang akan diuji dan hasil yang diharapkan serta penerapan praktisnya	53
BAB 4	METODE PENELITIAN	55
4.1	Jenis penelitian	55
4.2	Rancangan penelitian	55
4.3	Tempat dan waktu penelitian	55
4.4	Populasi sampel dan besar sampel	56
4.4.1	Sampel penelitian	56
4.4.2	Estimasi besar sampel	56
4.4.3	Tehnik pengambilan sampel	57
4.5	Variabel penelitian	57
4.5.1	Klasifikasi variabel	57
4.5.1.1	Variabel tergantung	57
4.5.1.2	Variabel bebas	58
4.5.1.3	Variabel kendali	58
4.5.1.4	Variabel moderator	58
4.6	Definisi operasional variabel	58
4.6.1	Variabel tergantung	58
4.6.2	Variabel bebas	59
4.6.3	Variabel kendali	59
4.6.4	Variabel moderator	60
4.7	Materi penelitian	60
4.8	Prosedur penelitian dan tehnik analisis data	63
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	75
5.1	Hasil penelitian	75
5.1.1	Berat testis mencit kiri dan kanan	75
5.1.2	Diameter tubulus seminiferus	77
5.1.3	Tebal epitel tubulus seminiferus	77
5.1.4	Jumlah sel spermatosit primer terkoreksi	80
5.1.5	Jumlah sel spermatid terkoreksi	81
5.1.6	Berat badan mencit	83
5.2	ANALISIS DATA PENELITIAN	85
5.2.1	Berat testis mencit	85
5.2.2	Diameter tubulus seminiferus	87
5.2.3	Tebal epitel tubulus seminiferus	89
5.2.4	Jumlah sel spermatosit primer terkoreksi	92
5.2.5	Jumlah sel spermatid terkoreksi	94
5.2.6	Berat badan mencit	96

BAB 6 PEMBAHASAN	98
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	106
7.1 Kesimpulan	106
7.2 Saran	106
DAFTAR PUSTAKA	108
LAMPIRAN	114

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Rata-rata data hasil penimbangan berat testis mencit kelompok kontrol dan sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (gram).	76
Tabel 5.2 Rata-rata data diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dan sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (mikron)	77
Tabel 5.3 Rata-rata data tebal epitel tubulus seminiferus kelompok kontrol dan sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (mikron)	77
Tabel 5.4 Rata-rata data jumlah sel spermatosit primer terkoreksi kelompok kontrol dan sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	80
Tabel 5.5 Rata-rata data jumlah sel spermatid terkoreksi kelompok kontrol dan sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	81
Tabel 5.6 Rata-rata data berat badan mencit awal dan akhir sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (gram)	83
Tabel 5.7 Rangkuman analisis varian satu arah berat testis mencit kiri dan kanan	85
Tabel 5.8 Rangkuman hasil uji BNT berat testis kiri dan kanan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	86
Tabel 5.9 Rangkuman analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus ..	87
Tabel 5.10 Rangkuman hasil uji BNT diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	88
Tabel 5.11 Rangkuman hasil analisis regresi diameter tubulus seminiferus	89
Tabel 5.12 Rangkuman analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus	89
Tabel 5.13 Rangkuman hasil uji BNT tebal epitel tubulus seminiferaus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	90

	Halaman
Tabel 5.14 Rangkuman hasil analisis regresi diameter tubulus seminiferus ...	91
Tabel 5.15 Rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatosit primer terkoreksi.	92
Tabel 5.16 Rangkuman hasil uji BNT jumlah sel spermatosit primer terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	93
Tabel 5.17 Rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatosit primer terkoreksi	93
Tabel 5.18 Rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatid terkoreksi	94
Tabel 5.19 Rangkuman hasil uji BNT jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan	95
Tabel 5.20 Rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatid terkoreksi ...	95
Tabel 5.21 Rangkuman analisis varian satu arah berat badan mencit awal dan akhir	97

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1.1 Diagram batang rata-rata berat testis kanan dan kiri pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (gram)	76
Gambar 5.1.3 Diagram batang rata-rata diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (mikron)	78
Gambar 5.1.3a Foto struktur anatomi tubulus seminiferus dari mencit jantan dewasa pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	79
Gambar 5.1.5 Diagram batang rata-rata jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	82
Gambar 5.1.6 Diagram batang rata-rata berat badan mencit awal dan akhir sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L (gram)	84
Gambar 5.2.1 Hubungan berat testis kiri dan kanan dengan dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	87
Gambar 5.2.2 Hubungan diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus dengan dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	91
Gambar 5.2.3 Hubungan jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi dengan dosis ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L	96

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Berat badan mencit awal dan akhir (gram)	114
Lampiran 2	Berat testis mencit kelompok kontrol dan perlakuan (gram)	115
Lampiran 3	Diameter tubulus seminiferus kelompok kontrol dan perlakuan (mikron)	116
Lampiran 4	Tebal epitel tubulus seminiferus kel. kontrol dan perlakuan (mikron)	120
Lampiran 5	Jumlah sel spermatosit primer kelompok kontrol dan perlakuan	124
Lampiran 6	Jumlah sel spermatid kelompok kontrol dan perlakuan	128
Lampiran 7	Diameter inti sel spermatosit primer kel. kontrol dan perlakuan (mikron)	132
Lampiran 8	Diameter inti sel spermatid kelompok kontrol dan perlakuan (mikron)	136
Lampiran 9	Jumlah sel sertoli kelompok kontrol dan perlakuan	140
Lampiran 10	Penghitungan jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi	144
Lampiran 11	Data rata-rata berat badan mencit, berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatosit primer dan spermatid terkoreksi, diameter inti sel spermatosit dan spermatid, jumlah sel Sertoli	146
Lampiran 12	Uji normalitas sampel berat testis, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi, berat badan mencit.....	147
Lampiran 13	Hasil analisis varian satu arah berat testis kiri dan kanan	148
Lampiran 14	Hasil uji BNT berat testis kiri dan kanan	149
Lampiran 15	Hasil analisis varian satu arah diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus	150

Lampiran 16	Hasil uji BNT diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus	151
Lampiran 17	Hasil uji analisis regresi diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus	152
Lampiran 18	Hasil analisis varian satu arah jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi	153
Lampiran 19	Hasil uji BNT jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi	154
Lampiran 20	Hasil uji analisis regresi jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi	155
Lampiran 21	Hasil analisis varian satu arah berat badan mencit awal dan akhir ..	156
Lampiran 22	Hasil uji korelasi antara berat badan mencit dengan variabel tergantung	157

BAB 1**PENDAHULUAN****1.1. Latar belakang masalah**

Tanaman *Phyllanthus niruri* L dengan nama daerah meniran/meniran ijo (Jawa), memeniran (Sunda) banyak ditemukan dan tumbuh di seluruh wilayah Indonesia sebagai tanaman liar dan bahkan dikategorikan sebagai gulma tanaman produksi. Tanaman ini telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai diuretika dan untuk pengobatan sakit ginjal dan sakit kuning (Materia Medika 1987).

Ekstrak dari tanaman *Phyllanthus niruri* L telah banyak digunakan dalam pengobatan sehari-hari sebagai imunostimulator, bahkan dalam pengobatan terapi imun terhadap infeksi virus terutama infeksi hepatitis B, ekstrak tanaman ini digunakan dalam jangka panjang (Ma'at, 1997). Sehingga diperkirakan akan mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten di berbagai organ, termasuk organ reproduksi.

Sampai saat ini masih belum diketahui efek tanaman ini terhadap spermatogenesis baik pada hewan atau pada manusia.

Pada penelitian Ma'at (1997), pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L peroral pada mencit menunjukkan pengaruhnya pada fungsi dan aktivitas sistem imun yaitu sebagai imunostimulator. Hal ini ditunjukkan antara lain dengan adanya peningkatan aktivitas monosit/makrofag pada fungsi fagositosis dan kemotaksis dan sekresi beberapa sitokin oleh sel-sel imunogenik. Salah satu sitokin tersebut

adalah Tumor Necrosis Factor (TNF- α) oleh limfosit subset T helper -1 (Subset Th-1). TNF - α dapat mengaktifasi monosit/makrofag untuk melepas Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL6) dan TNF - α itu sendiri, juga merangsang fungsi fagositosis dan kemotaksis. (Ma'at, 1997).

Khan et al. (1987) Penelitian pada tikus testis yang dihomogenasi, kemudian tubulus seminiferus diisolasi, menunjukkan bahwa konsentrasi dari IL-1 banyak terdapat pada sel Sertoli dan sel Germinal pada tikus dewasa. Aktivitas IL-1 terutama pada proliferasi sel selama spermatogenesis berlangsung.

Dwight et al. (1990) pada penelitiannya, bahwa TNF - α dan IL-1 meningkatkan produksi testosteron pada testis tikus dewasa yang telah diuraikan jaringannya dan pada sel Leydig yang dimurnikan. Efek sitokin ini diduga melalui pengaruhnya pada makrofag intra testikular dan juga langsung pada sel Leydig. Ini dibuktikan dengan peningkatan kadar testosteron terjadi secara bermakna baik pada testis yang diuraikan jaringannya dan pada sel Leydig yang dimurnikan.

TNF- α adalah sitokin yang diproduksi antara lain oleh makrofag. Xiong (1993) telah menunjukkan bahwa TNF- α dapat menginhibisi produksi testosteron oleh sel Leydig secara dosis dependen, artinya makin besar dosis, makin kuat inhibisinya, baik dalam memproduksi testosteron basal maupun yang distimulasi oleh 8-Bromo cyclic Adenosine Mono Phosphat (8-Br-cAMP)

Hutson (1993), makrofag telah diketahui berperan penting dalam komunikasi dengan sel lain diluar sistem imun, termasuk dengan sel Leydig dengan cara parakrin. Pada suatu percobaan *in-vitro*. Telah ditunjukkan bahwa bila media kultur makrofag intratestikular dapat mempengaruhi testosteron ketika

ditambahkan pada sel-sel Leydig, faktor yang bertanggung jawab saat itu belum diketahui. Suatu studi serial menunjukkan bahwa TNF- α yang diproduksi oleh makrofag mampu mempengaruhi sel Leydig.

Kretser (1995), testis mempunyai dua fungsi penting yaitu fungsi spermatogenesis yang memproduksi spermatozoa dan fungsi steroidogenesis yang memproduksi testosteron. Sel Leydig dalam jaringan interstisial testis, diketahui mampu memproduksi testosteron. Testosteron ini pada individu jantan diperlukan untuk perkembangan tanda kelamin primer dan sekunder serta proses spermatogenesis. Perubahan kadar testosteron dalam testis diketahui dapat menyebabkan perubahan pada proses spermatogenesis.

Nehar et al (1997), TNF- α meningkatkan aktivitas asam laktat dehidrogenase yang mengubah asam piruvat menjadi asam laktat. Didalam tubulus seminiferus TNF- α memberikan *signal* kepada sel germinal untuk meningkatkan produksi asam laktat melalui sel Sertoli. Asam laktat dipergunakan untuk energi metabolisme sel germinal.

Benahmed (1997), dalam gonad TNF- α disekresi oleh makrofag jaringan interstisial dan oleh sel germinal dalam tubulus seminiferus. Reseptor untuk TNF- α telah dideteksi terdapat di dalam sel somatik testis yaitu sel Leydig dan sel Sertoli. TNF- α mempunyai dua peran penting dalam mekanisme pengaturan hormonal dalam testis. Pada sel Leydig TNF- α menyebabkan inhibisi Lutinizirg hormone (LH) dengan menginduksi sintesis testosteron, sedangkan pada sel Sertoli menghambat Follicle Stimulating Hormone (FSH) dengan menginduksi

sintesis inhibin. Akan tetapi TNF- α yang diproduksi oleh sel germinal akan meningkatkan ekspresi growth factor (GF) oleh sel Sertoli, yang berakibat meningkatnya bahan-bahan metabolik energi seperti asam laktat yang penting untuk metabolisme sel germinal. Dapat disimpulkan bahwa TNF- α berperan penting sekali pada fungsi testis seperti spermatogenesis, disamping pengaturan proses steroidogenesis dan interaksinya dengan sistem imun.

Cohen (1998), IL-1 mempunyai fungsi yang berhubungan dengan sel diluar sistem imun, termasuk dengan sel organ reproduksi jantan, misal dengan sel yang berhubungan dengan proses steroidogenesis. Akan tetapi efeknya masih kontradiksi tergantung pada kondisi eksperimen. Sejumlah studi menyebutkan IL-1 mempunyai peran pada makrofag dalam pengaturan proses steroidogenesis, sementara studi yang lain, IL-1 mempunyai efek menghambat biosintesis testosteron baik pada *in-vivo* maupun *in-vitro*, studi yang lain lagi menyebutkan pengaruh stimulasi IL-1 pada sekresi testosteron oleh sel Leydig. Pada studi terakhir dibuktikan bahwa IL-1 mengatur sintesis DNA selama berlangsungnya spermatogenesis dan juga meningkatkan proliferasi sel spermatogonia secara *in-vivo*. Pada penelitian cohen ini dijelaskan bahwa IL-1 tidak berpengaruh pada fungsi sel Leydig atau pada spermatogenesis.

Wang (1998), Sitokin IL-1 yang diproduksi oleh sel Sertoli dan sel germinal yang masih muda pada tikus, mempunyai peran pengaturan spermatogenesis secara autokrin dan atau parakri. Pada studi Wang, lokalisasi reseptor IL-1 telah diketahui terdapat pada sel Sertoli dan sel Peritubular. Tidak ada data yang menyebutkan terdapat reseptor pada sel spermatisit pakiten atau pada sel

spermatid bulat. Juga pada studi ini didapatkan bahwa fagositosis badan residu (residual bodies) akan memicu sel Sertoli untuk mensekresi IL-1, yang secara autokrin mempengaruhi spermatogenesis.

Permasalahannya yang ada sekarang adalah belum diketahui efek dari pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L terhadap respon imun dari sel-sel imunokompeten yang berpengaruh terhadap aktivitas reproduksi baik langsung maupun tidak langsung melalui pengaruhnya terhadap sekresi beberapa sitokin intratestikuler. Belum diketahui berapa besar dosis pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L sehingga dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan kemotaksis *in vivo* monosit / makrofag dan dapat meningkatkan sekresi TNF- α oleh subset T helper -1, selanjutnya TNF- α dapat mengaktifasi komponen sistem imun monosit/makrofag untuk melepas IL-1, IL-6 dan TNF- α sendiri.

Oleh karena pemberian per-oral *Phyllanthus niruri* L dapat menstimulir sekresi TNF- α oleh subset Th-1, diperkirakan akan mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten dalam testis terutama monosit/ makrofag, yang selanjutnya akan mempengaruhi proses spermatogenesis, efek semacam ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan ilmu kesehatan reproduksi.

Sejauh yang penulis ketahui, penelitian mengenai pengaruh pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada sistem reproduksi jantan, khususnya pada testis belum pernah dilakukan baik pada manusia maupun pada hewan percobaan. sehubungan dengan hal tersebut maka perlu mengetahui dan membuktikan manfaat pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L. Oleh karena tidak mungkin dilakukan pada manusia maka penulis memilih mencobanya dulu pada binatang percobaan mencit jantan (*Mus musculus*).

Seperti disebutkan diatas ada pengaruh sitokin yang masih kontradiksi apakah bisa menghambat atau merangsang atau tidak berpengaruh pada proses spermatogenesis. Untuk itu diperlukan perlakuan pemberian dosis bertahap selama satu setengah siklus spermatogenesis mencit dari ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara per-oral sehingga dapat tercapai apa yang dimaksud tanpa efek samping yang berarti.

Bila pengaruhnya adalah merangsang spermatogenesis, maka penelitian ini bisa dijadikan dasar untuk penelitian lebih lanjut penggunaan ekstrak tanaman ini untuk pengobatan gangguan spermatogenesis. Akan tetapi sebaliknya bila ternyata justru mengakibatkan hambatan pada proses spermatogenesis, maka ada kemungkinan dikembangkan untuk tujuan kontrasepsi pada laki-laki.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka yang menjadi pokok permasalahan penelitian adalah :

Apakah pemberian per-oral ekstrak *phyllanthus niruri* L pada beberapa dosis tertentu bertahap, selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) akan mempengaruhi proses spermatogenesis mencit jantan (*Mus musculus*)?

1.3. Tujuan penelitian

Tujuan umum :

Mengetahui efek pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L terhadap proses spermatogenesis mencit jantan, yang akan diambil manfaatnya untuk pengembangan ilmu kesehatan reproduksi

Tujuan khusus :

Untuk memperoleh data ilmiah pengaruh pemberian peningkatan dosis bertahap per-oral *Phyllanthus niruri* L selama 54 hari, akan mempengaruhi proses steroidogenesis dan proses spermatogenesis pada mencit jantan (*Mus musculus*)

1.4. Manfaat Penelitian

Akan diketahui kegunaan ekstrak tanaman ini pada bidang ilmu kesehatan reproduksi. Apabila didapatkan hasil hambatan pada proses spermatogenesis maka kemungkinan kelak bisa dikembangkan sebagai obat kontrasepsi pria atau harus berhati-hati pada penggunaan ekstrak tanaman ini sebagai imunostimulator pada pasangan yang kurang subur, tetapi bila pengaruhnya merangsang spermatogenesis maka terbukalah penelitian lebih lanjut penggunaan ekstrak tanaman ini untuk gangguan proses spermatogenesis.

Bab 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Organ reproduksi mencit jantan (*Mus musculus*)

Organ reproduksi mencit jantan terdiri atas sepasang testis yang terdapat didalam scrotum sebagai alat reproduksi utama yang dilengkapi dengan saluran reproduksi : epididymis, ductus deferens serta kelenjar tambahan yang terdiri dari kelenjar prostat, vesicula seminalis, kelenjar bulbo urethralis dan penis di bagian luar tubuh (Delman and Brown, 1992)

2.1.1. Histologi testis mencit

Testis merupakan kelenjar tubuler yang sangat kompleks dan mempunyai dua fungsi yaitu fungsi eksokrin dan fungsi endokrin. Fungsi eksokrin yaitu spermatogenesis yang terjadi di tubulus seminiferus memproduksi spermatozoa, sedangkan fungsi endokrin yaitu proses steroidogenesis yang terjadi pada sel Leydig memproduksi hormon testosteron dan derivatnya (Ferdinandus, 1980)

Testis terletak dalam scrotum berperan penting dalam mempertahankan suhu testis agar tetap berada dibawah suhu tubuh, kondisi ini diperlukan agar proses spermatogenesis berjalan normal. Berat testis berkorelasi positif terhadap berat badan (Thwaits and Hannan, 1989).

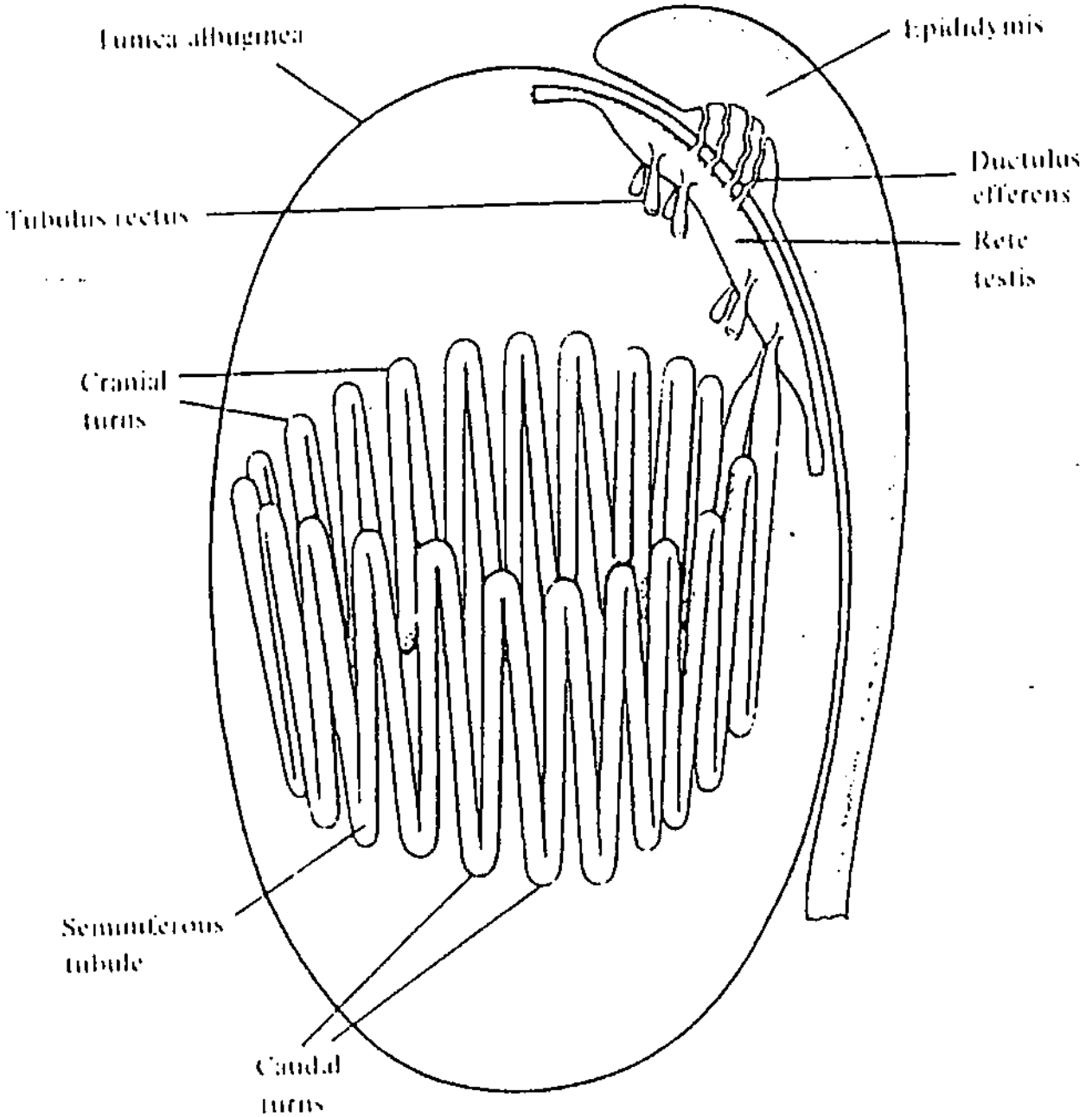
Testis dihubungkan dengan beberapa saluran untuk membawa spermatozoa keluar yaitu epididimis, duktus deferens dan urethra di dalam penis (Delman and Brown, 1992).

Testis diselimuti oleh tiga lapisan yaitu tunika vaginalis yang dibangun oleh satu lapisan mesotelium, duduk di suatu membrana basalis, memisahkan tunika vaginalis dengan lapisan yang lebih tebal dan letaknya ditengah dinamakan tunika albugenia. Tunika vaginalis ini sering kali mengalami kerusakan pada waktu membuat sediaan. Tunika albugenia terdiri dari jaringan fibroblas dan sel otot polos. Lapisan bagian dalam testis adalah tunika vasculosa yang memiliki banyak pembuluh darah.

Testis sendiri tersusun atas banyak bentukan seperti pipa/ saluran halus (tubule), yang berjalan berlekuk-lekuk, dengan kedua muaranya berhubungan dengan rete testis melalui tubuli recti, pipa-pipa kecil tersebut disebut tubuli seminiferi (Ferdinandus, 1980).

Pada bagian posterior testis terdapat penebalan tunika albugenia yang berjalan memasuki testis disebut mediastinum testis. Dari mediastinum menyebar sekat-sekat fibrous dan pipih membagi bagian dalam testis menjadi kurang lebih 250 lobuli. Tiap-tiap lobulus terdapat 1 - 4 tubuli seminiferi, yang terbenam dalam stroma jaringan ikat kendor yang mengandung banyak pembuluh darah, pembuluh limfa, syaraf, sel-sel interstisial yang lain misalnya makrofag dan sel utama yaitu sel Leydig. Sel ini mempunyai ukuran besar, berkelompok dan mampu mensekresi hormon steroid terutama testosteron atas rangsangan hormon lutenizing hormon (LH) yang diproduksi oleh hipofise anterior.

2.1.2. Struktur tubulus seminiferus



Gambar 2.1. Ilustrasi untuk menunjukkan satu tubulus seminiferus yang berhubungan dengan rete testis (Leblond CP and Clermont Y, 1952)

Tubulus seminiferus merupakan saluran atau pipa halus berkelok-kelok dengan penampang kurang lebih 250 mikron, panjangnya 30 sampai 70 cm yang merupakan bagian terbesar pembentuk testis. Tubulus seminiferus mengisi lebih dari 90 % dari massa testis. Beberapa tubulus ini menempati ruangan kecil berbentuk piramida yang disebut lobulus, bermuara sebagai ujung-ujung akhir yang bebas atau sebagai bagian lingkaran yang mengadakan anastomose dengan tubulus lain dalam satu lobulus atau dengan tubulus dari lobulus yang terdekat (Ferdinandus, 1980).

Didalam tubulus seminiferus terdapat beberapa macam sel germinal misalnya spermatogonium, spermatosit primer dan sekunder, spermatid serta spermatozoa. Disamping itu terdapat pula sel Sertoli yang mempunyai peranan penting untuk memberi nutrisi, proteksi dan hormonal terhadap sel germinal (Johnson dan Everitt, 1988). Semua tubulus seminiferus bermuara ke satu arah dan berkumpul membentuk rete testis di daerah mediastinum. Rete testis melanjutkan ke duktus eferen kemudian ke mediastinum bagian dorsal untuk membentuk caput epididimis (Dellman & Brown, 1992).

Sel germinal selanjutnya mengembangkan ekor dan kelak menjadi spermatozoa yang menuju ke arah lumen tubulus. Tubulus seminiferus dibatasi oleh membrana basalis. Sel-sel penyusun tubulus seminiferus adalah epitel berlapis kuboid yang berubah-ubah, yang melekat langsung pada membrana basalis yang pipih. Sel epitel tersebut adalah spermatogonia tipe A, spermatogonia antara dan sel Sertoli (Ferdinandus, 1980). Sel germinal menyusun suatu epitelium berlapis pipih, empat sampai delapan lapis sel, yang meliputi bagian dalam tubulus seminiferus. Dinding membrana basalis sebelah luar terdiri dari sel

peritubuler myoid yang memiliki ciri otot polos dan beberapa lapis fibroblas yang mempunyai fungsi membantu pembentukan blood testis barrier (BTB) pada sisi luar dan dapat berkontraksi oleh karena ada filamen dan otot polos untuk membantu mengeluarkan sperma dari testis (Ross and Reith, 1985).

Sel Sertoli mempunyai bentuk dasar kolumnar dengan prosesus apikal dan lateral yang mengisi ruang diantara sel spermatogenik, berinti ovoid atau trianguler. Sel Sertoli yang berdekatan dihubungkan oleh tight junction dan gap junction. Komplek junction ini membentuk blood testis barrier yang melindungi sel germinal yang sedang berkembang terhadap bahan-bahan yang bermolekul besar dan sebaliknya, mencegah masuknya produk aktifitas spermatogenesis ke dalam tubuh yang dapat membangkitkan reaksi imun (Ganong, 1993).

Sel Sertoli, bentuknya bervariasi dari stage yang satu ke stage yang lain. Menurut bentuknya, pada penampang tubulus seminiferus dapat dibagi dua, yaitu :

1. Flat atau oval nuclei = paralel nuclei , sumbu panjangnya sejajar dengan membran basal.
2. Triangular atau oblong nuclei = Perpendicular nuclei, sumbu panjangnya tegak lurus pada basal membran.

Di dalam tubulus sel germinal dengan berbagai tahap perkembangan tidak terdistribusi secara acak tetapi "tertata" dengan pola asosiasi tertentu. Waktu antara penampakan asosiasi sel tertentu dengan asosiasi sel yang sama berikutnya disebut satu siklus epitelium. Satu siklus epitelium mencit dapat dibedakan atas 14 jenis asosiasi sel dan memerlukan waktu sekitar 8-9 hari. Proses spermiogenesis pada mencit melalui 19 langkah/ tahap sedangkan pada manusia hanya terdiri dari 6 tahap yang memerlukan waktu 16 hari. Perubahan jumlah sel yang berasosiasi



pada tahap tertentu dapat dijadikan indikator adanya gangguan spermatogenesis (Tienhoven, 1983).

Tahapan-tahapan siklus epitel seminiferus, terdapat 14 stages/ tahapan/ tingkatan, yang penulisannya dengan angka romawi (I s.d XIV). Pada stage I kepala spermatozoa yang belum matang biasanya jauh dari membrana basalis dan sitoplasmanyamirip bentukan globular didalam lumen. Pada stage II-V, kepala spermatozoa sudah berkelompok sehingga disebut *bundles* yang bisa penetrasi cukup dalam pada lapisan epitel. Pada stage VI bundles tersebut mulai bergeser kearah lumen, sehingga pada stage VII dan terutama pada stage VIII, kepala spermatozoa yang belum matang tersebut sudah melingkupi sekitar lumen dengan ekor yang membentuk pusaran ditengah lumen. Pada stage IX spermatozoa telah pergi meninggalkan lumen, dan lapisan terdalam saat itu adalah spermatid muda, yang mana topinya (head cap) telah terorientasi pada membrana basalis dan sitoplasmanya terakumulasi pada sisi sebelah lumen. Selama stage X-XIII , spermatid memanjang dan bentukan globular sitoplasmanya dapat dilihat didalam lumen. Akhirnya pada stage XIV, akan tampak sedikit disorganisasi dari seluruh epitel sehubungan dengan pembagi-dirian dari spermatosit primer dan spermatosit sekunder. Disini akan dibicarakan agak mendalam tentang stage VII karena stage ini akan dipakai sebagai pembanding antar hewan kontrol dan perlakuan dan stage sebelumnya (VI) dan stage sesudahnya (VIII).

Stage VI, diawali dengan telah tumbuhnya topi dari spermatid pada stage VI, yang dari pandangan samping tampak seperti sebuah topi kecil pada permukaan luar suatu kutub inti. Jumlah sel Sertoli tipe perpendikular akan meningkat pada stage VI, VII dan VIII, tetapi masih selalu lebih sedikit dibanding

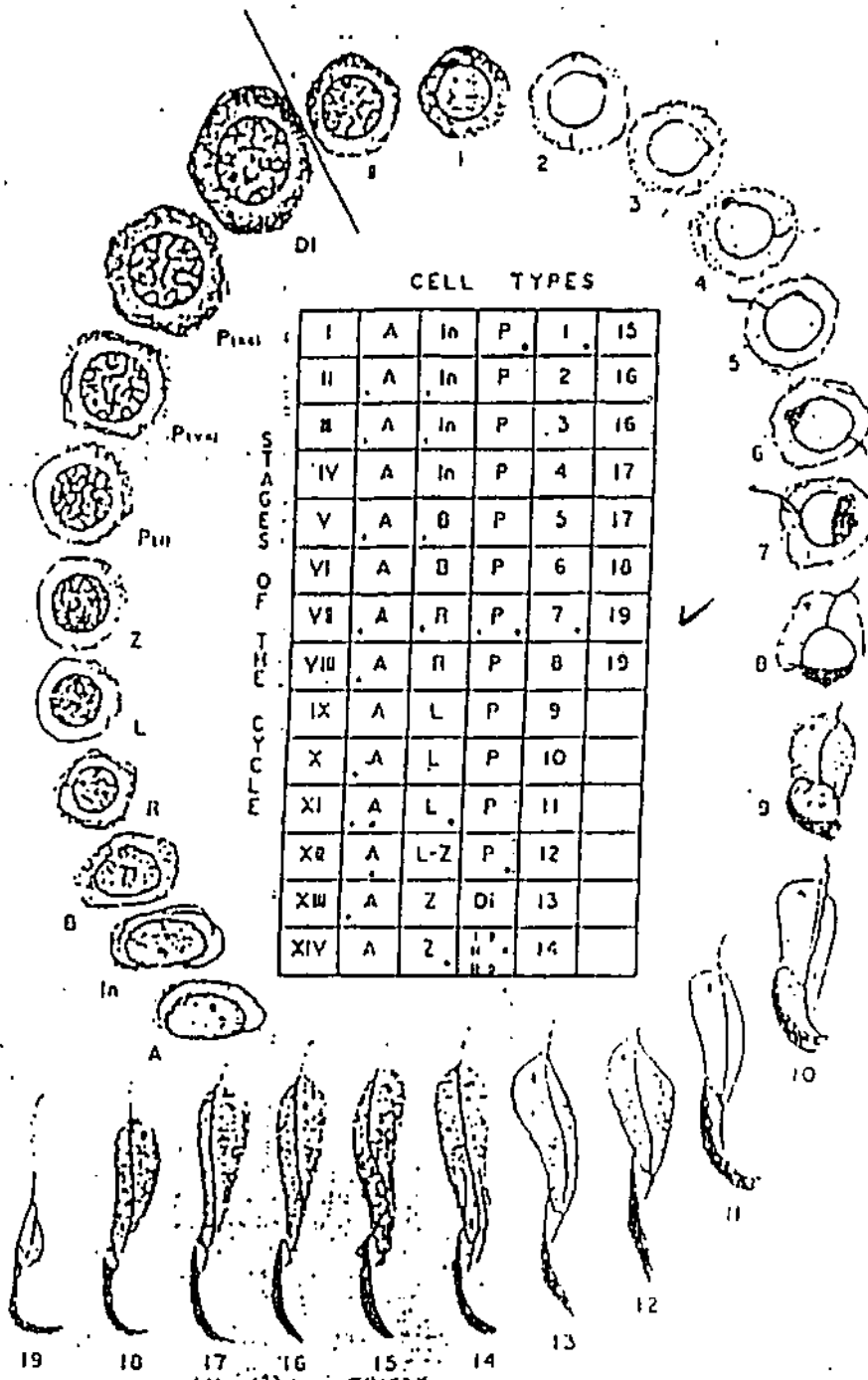
dengan tipe paralel. Spermatogonia A dan cukup banyak tipe B terletak sepanjang membrana basalis. Selama stage ini berlangsunglah pembelahan mitosis spermatogonia B membentuk spermatosit muda yang khas adalah pada stadia pakiten. Spermatid muda dan spermatozoa yang belum matang tahap 18 tampak berada pada stage VI. Spermatozoa muda ini cenderung melepaskan diri dari elemen sel Sertoli dan dijumpai pada level yang berbeda-beda, umumnya berada pada pertengahan antara lumen dan membrana basalis

Stage VII, diawali dengan tercapainya ukuran maksimal dari topi spermatid. Spermatogonia A jarang ditemukan, sedangkan tipe B telah membelah diri membentuk generasi baru spermatosit pada stage VI. Spermatosit muda ini disebut *resting* spermatosit, yang terdapat sepanjang membrana basalis dengan inti mengandung pengelompokan kromatin yang gambarannya mirip dengan spermatogonia tipe B, hanya ukurannya lebih kecil. Spermatosit yang lebih tua terdapat dalam stadia pakiten. Lebih kearah tengah didapatkan spermatid muda dan spermatozoa muda telah meninggalkan *budlanya*. Spermatozoa muda tersusun sepanjang tepi lumen tubulus, tetapi tidak selalu teratur. Ekornya mengambang dan membentuk gambaran pusaran pada daerah lumen.

Stage VIII, diawali dengan pengaturan letak sistem akrosom spermatid muda yang semuanya mengarah ke membrana basalis. Pada stage ini tipe sel Sertoli jenis perpendikular mencapai puncaknya. Spermatogonia tipe A sudah jarang tampak, dan terdapat berselang-seling dengan spermatosit muda. Pada saat itu sel spermatosit muda meleburkan kromatinnya yang kelam menjadi butiran halus. Lebih dekat kearah lumen didapatkan suatu lapisan dari spermatosit pakiten,

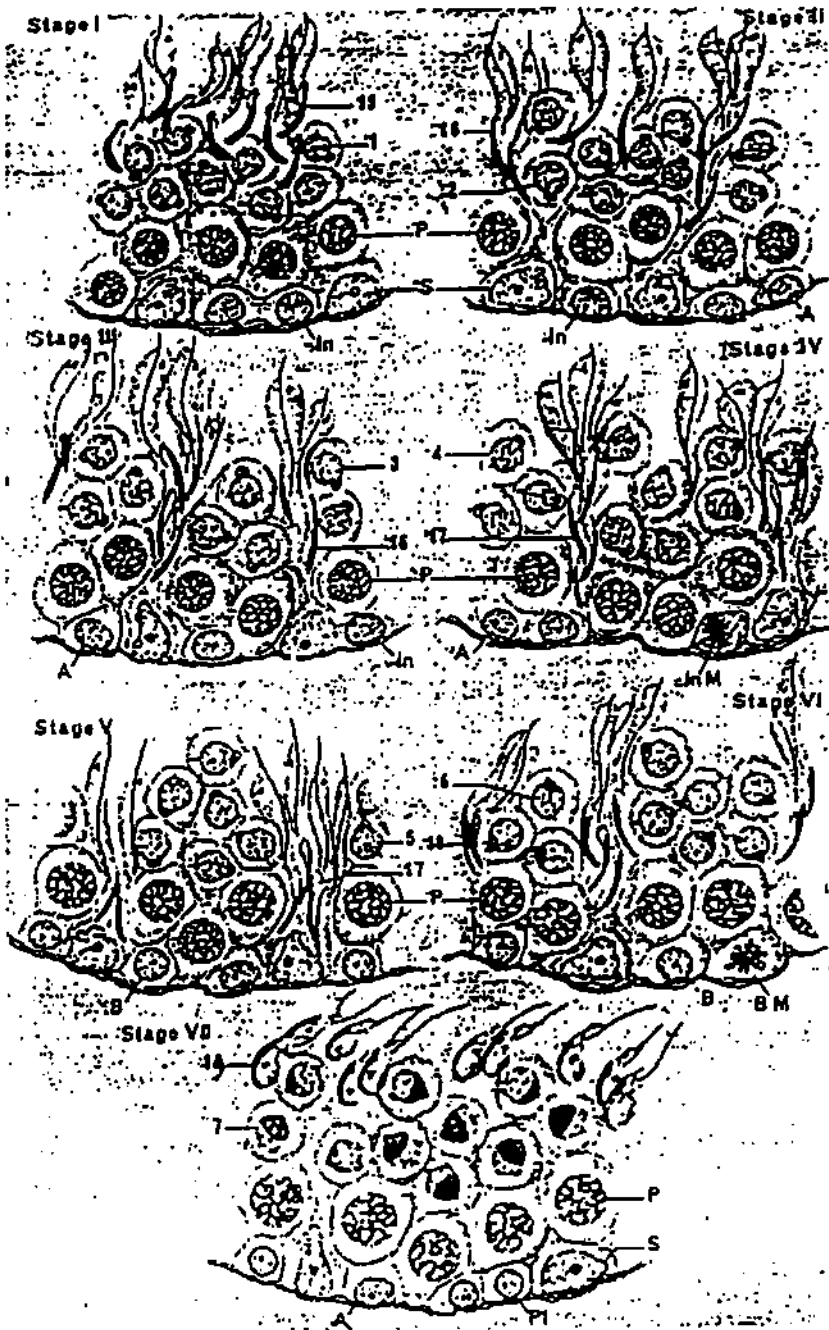
diikuti oleh spermatid dan akhirnya spermatozoa muda (tahap 19). (Leblond and Clermont, 1952).

Di dalam ruang antara tubulus seminiferus didapatkan sel interstitial atau sel Leydig (penghasil androgen), kapiler darah dan pembuluh limfe serta sel-sel darah putih antara lain sel makrofag terdapat dalam populasi yang besar (de Kretser and kerr, 1988).



Gambar 2.2 : Tahap-tahap spermatogenesis meiotik dengan asosiasi sel tertentu (baris).

A = spermatogonia tipe A; In = spermatogonia intermedia; B=spermatogonia tipe B ; R=Spermatosit primer dalam tahap istirahat; L = spermatosit leptoten; Z=spermatosit zigoten; P2(I)1, P2(VII)1, P2(XII) = spermatosit pakiten awal, tengah dan akhir; Di = diploten; II = spermatosit sekunder; 1-19 tahapan spermatid dalam spermatogenesis (Tienhoven, 1983)



Gambar 2.2.a Urutan 14 tingkatan (romawi I - XIV) dari siklus epitel seminiferus pada mencit.

A, In, dan B = tipe A, tipe intermedia, dan tipe B; InM, BM = tipe intermedia dan tipe B dalam mitosis; P = spermatosit primer proleptoten; L = spermatosit leptoten; Z = spermatosit zygoten; P = spermatosit pakten; S = sel Sertoli; D = spermatosit diploten; II = spermatosit sekunder, IM, IIM = meiosis I dan II; 1-19 variasi tahap spermatid dari spermatogenesis; RB = badan residual (Tienhoven, 1983)

2.2. Poros hipotalamus - hipofise - testis

Hipotalamus yang mensekresi Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) mempunyai peranan penting dalam merangsang hipofise anterior untuk memproduksi gonadotropin yaitu follicle Stimulating Hormone dan lutenizing Hormone (FSH dan LH), yang targetnya adalah sel Sertoli, sel germinal serta tubulus seminiferus. Selanjutnya FSH merangsang sel Sertoli untuk mengaktifkan enzim Adenylsiklase dalam merubah Adenosin TriPhospat (ATP) menjadi 3' 5' siklik Adenosin MonoPhospat (cAMP), dimana cAMP ini merangsang pembentukan Androgen Binding Protein (ABP) yang berfungsi sebagai alat transportasi hormon androgen didalam tubulus seminiferus. Peran FSH juga menstimulasi sel germinal agar lebih sensitif terhadap androgen, Interaksi hormon androgen, sel germinal dan sel Sertoli sangat diperlukan guna berlangsungnya proses spermatogenesis.

Jika terjadi penurunan stimulasi endokrin, sel akan beradaptasi dengan mereduksi komponen-komponen selnya dengan jalan meningkatkan aktivitas protease proteolitik sebagai mekanisme adaptasi. Dalam keadaan demikian sel Sertoli akan mereduksi jumlah mitokondria dan retikulum endoplasmik. Kondisi kekurangan yang berkepanjangan akan mengakibatkan ukuran sel terus menyusut mengalami atropi, sel Sertoli nampak pipih dengan inti pipih (flattened) dan bila dilihat dengan mikroskop elektron banyak ditemukan vakuolisasi di daerah kompleks junction antar sel Sertoli (Bardin et al, 1988)

Sel Sertoli juga mensekresi Inhibin yang berperan sebagai umpan balik negatif terhadap produksi FSH. Inhibin adalah protein yang larut dalam air didapat dalam beberapa bentuk, bebas dari estrogen dan testosterone (non steroid) dengan

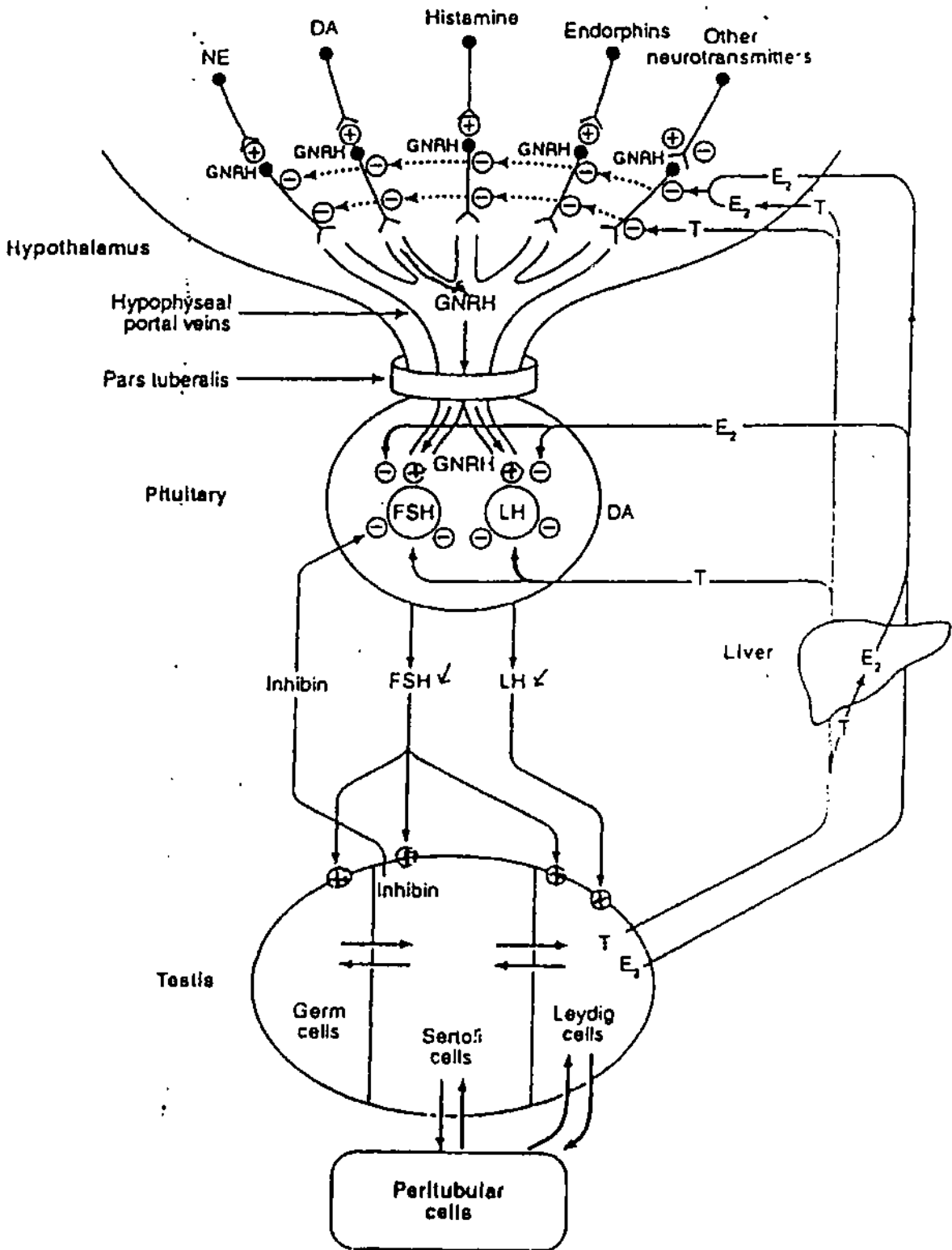
berat molekul 10.000 yang dapat menghambat FSH. Inhibin menghambat FSH baik secara langsung atau tidak (penurunan sekresi ABP oleh sel Sertoli) dapat mempengaruhi proses spermatogenesis. Sedangkan LH dibutuhkan untuk merangsang sel Leydig dalam jaringan interstisial testis dalam pembentukan hormon steroid misal: testosteron, dihidrotestosteron dan estradiol (Hafez, 1987). Dari testis keluar ke pembuluh darah vena testis kemudian ditranspor ke plasma.

LH merupakan senyawa glikoprotein, yaitu kompleks protein karbohidrat, LH mengandung dua rantai peptida yang berbeda, yaitu subunit α dan subunit β . Subunit α terdiri dari 89 asam amino sedangkan subunit β 115 asam amino. LH pada testis bekerja pada sel Leydig untuk merangsang sintesis tetosteron. Sekresi LH kedalam sirkulasi oleh kelenjar hipofise anterior dapat dihambat oleh adanya umpan balik negatif testosteron baik secara langsung pada hipofises- anterior maupun pada sekresi GnRH oleh hipotalamus (Ganong, 1993).

Hormon FSH seperti halnya LH merupakan hormon yang mengandung sub-unit α dan subunit β . FSH bekerja pada sel sertoli. Ikatan antara FSH dengan reseptor pada membran sel Sertoli mengakibatkan peningkatan sintesis cAMP dalam sitoplasma yang kemudian mengaktifasi protein kinase, diikuti proses fosforilasi berbagai jenis protein mengakibatkan aktivasi berbagai fungsi sel sertoli. Beberapa fungsi sel sertoli yang dipengaruhi oleh hormon FSH antara lain adalah sintesis ABP dan sintesis inhibin (Tienhoven, 1983).

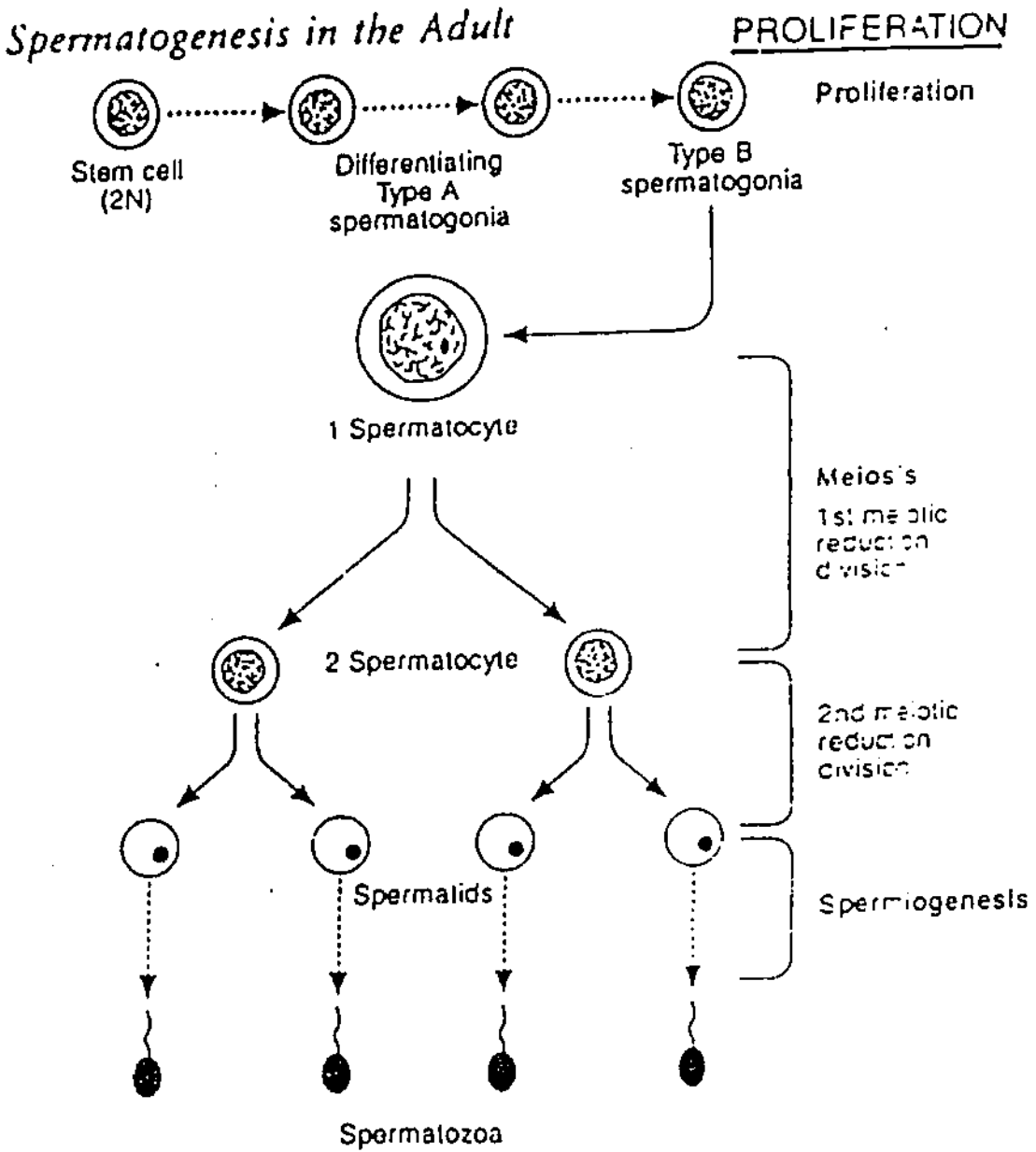
Hormon FSH merangsang sel Sertoli untuk mensintesis ABP, yang berfungsi sebagai pengikat testotesron didalam sel sertoli. Didalam lumen tubulus seminiferus, ABP menjaga konsentrasi testosteron tetap tinggi, yang diperlakukan dalam kelangsungan proses spermatogenesis dan sebagai pengangkut testosteron

dari testis ke epididimis (Tienhoven, 1983). FSH juga merangsang sel Sertoli untuk mensintesis inhibin yang berfungsi memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi FSH oleh kelenjar hipofise anterior dan ikut berperan dalam merangsang sintesis testosteron pada sel Leidig. Sebaliknya testosteron menghambat sekresi inhibin yang diinduksi FSH (Ganong, 1993). Peranan lain dari hormon FSH adalah juga meningkatkan sintesis glikoprotein dalam permukaan sel sehingga berperan dalam adesi antar sel Sertoli, meningkatkan jumlah reseptor androgen dalam sel Sertoli, memacu proliferasi sel-sel sertoli pada masa pra dan pasca natal, memacu prolifasi spermatogonia dan membantu LH meningkatkan bio sintesis androgen dalam sel Leidig (Hadley, 1992). Fungsi lain dari hormon FSH pada proses spermatogenesis adalah berperan sejak terjadinya proliferasi spermatogonia hingga terbentuknya spermatosit primer (Maekawa et al., 1992) dan terhadap perkembangan tahap akhir spermatid menjadi spermatozoa (Ganong, 1993).



Gambar 2.3 : Hubungan antara poros Hipotalamus - Hipofise anterior - Testis. (Insler, 1993)

2.3. Spermatogenesis



Gambar 2.4 : Skema pembelahan sel pada spermatogenesis dan spermiogenesis (Insler, 1993)

Proses spermatogenesis melibatkan interaksi hormonal antara hipotalamus yang mensekresi GnRH, hipofise anterior yang memproduksi gonadotropin yang terdiri dari FSH dan LH serta testis sendiri dimana sel Leydig yang mensekresi androgen, sel Sertoli dan sel germinal ikut berperan dalam proses spermatogenesis ini. (Ganong,1993)

Hormon FSH mendorong aktivitas spermatogenesis dari testis yaitu menstimulasi pertumbuhan sel germinal di tubulus seminiferus. Selain itu FSH juga berperan terhadap sel Sertoli untuk menghasilkan ABP. Hormon testosteron mempunyai fungsi mengatur kelakuan birahi hewan jantan, dan secara tidak langsung mendorong proses spermatogenesis bersama FSH (Hardjopranjoto, 1995).

Pada mamalia yang secara seksual sudah mencapai dewasa kelamin, epitelium tubulus seminiferus terdiri dari populasi non proliferasi sel Sertoli dan beberapa macam tingkat perkembangan sel germinal, mulai dari sel spermatogonia, spermatosit primer dan sekunder, spermatid sampai pada spermatozoa yang matang. Spermatogenesis diawali dari proliferasi spermatogonia yang berada pada bagian basal dari tubulus seminiferus yang dalam perkembangannya akan menjalani proses meiosis I & II yaitu mengurangi jumlah kromosom, untuk membentuk spermatid yang haploid. Proses perubahan dari spermatid yang haploid menjadi spermatozoa disebut spermiogenesis (de Kretser, 1992; Hess, 1990; Leblond et.al.,1952).

Menurut Hardjopranjoto (1995) proses spermatogenesis pada hewan mamalia dibagi menjadi 4 tahap yaitu :



1. Tahap proliferasi, tahap ini dimulai pada testis hewan sejak sebelum lahir sampai beberapa waktu setelah lahir. Tahap ini dimulai dengan spermatositogenesis, diawali dengan pembelahan sel spermatogonia yang diploid menjadi spermatogonia tipe A dan tipe B. Spermatogonia tipe A juga mampu membentuk spermatogonia seperti induknya semula yang dinamakan populasi stem cell (Renewal) yang berguna untuk mempertahankan jumlah spermatogonia dan untuk peremajaan.

2. Tahap tumbuh, pada tahap ini spermatogonium membelah secara mitosis sebanyak 4 kali sehingga dihasilkan 16 spermatosit primer. Lama periode ini kira-kira 15 sampai 17 hari. Tipe A berbentuk bulat, intinya jernih dengan selaput inti yang tipis, berkromosom diploid akan membelah 4 kali dan membentuk spermatogonia antara bentuknya lebih lonjong yang kemudian akan mengalami mitosis satu kali untuk membentuk spermatogonia tipe B yang mengandung kromatin yang kasar. Bentuknya lebih kecil dan ada kerak-kerak pada lapisan dalam membran inti yang tebal yang kemudian akan membelah satu kali lagi untuk membentuk spermatosit primer yang siap melakukan meiosis.

3. Tahap pemasakan, pada tahap ini terjadi pembelahan meiosis sehingga sel spermatosit primer berubah menjadi spermatosit sekunder dan jumlah kromosom menjadi separuhnya. Periode ini kira-kira berlangsung 15 hari. Beberapa jam kemudian spermatosit sekunder berubah menjadi spermatid.

4. Tahap transformasi, pada tahap ini terjadi metamorfosa seluler dari sel spermatid sehingga terbentuk sel spermatozoa. Proses ini dinamakan spermiogenesis. Periode ini membutuhkan waktu lebih kurang 15 menit. Jadi dari satu sel spermatogonium akan terbentuk 64 sel spermatozoa. Seluruh proses

pembentukan spermatozoa pada mencit jantan diperlukan waktu 34,5 - 35,5 hari (Raugh, 1968 ; Bennet and Vickery, 1970).

Pembagian lain dari proses spermatogenesis adalah fase spermatositogenesis dan spermiogenesis. Pada fase spermatositogenesis terjadi pertumbuhan jaringan spermatogenik dengan pembelahan mitosis, kemudian diikuti oleh pembelahan meiosis sehingga jumlah kromosom menjadi separuhnya. Proses ini berakhir dengan terbentuknya spermatid. Pada fase spermiogenesis spermatid akan mengalami metamorfose sampai terbentuk sel spermatozoa. Proses metamorfose ini meliputi pembentukan akrosom, kepala, badan dan ekor sel spermatozoa (Hardjopranjoto, 1995). Spermatogenesis mencit terjadi segera sesudah lahir, sedang spermatogenesis manusia terjadi pada saat pubertas dicapai.

2.3.1. Spermatisit primer

Pada manusia didalam proses spermatogenesis mula-mula spermatogonia tipe A mengalami proses mitosis sampai beberapa kali, dimana setiap sel turunannya menerima tetap 46 kromosom.

Spermatisit primer tahap praleptoten, yaitu sebagai hasil dari pembelahan spermatogonia tipe B pada akhir stage VI. sehingga mulai tampak pada stage VII dan VIII. Disini intinya bulat dan lebih kecil dengan kromatin yang besar dan mengeras terletak di permukaan dalam membran inti, kemudian segera masuk ke tahap pembelahan meiosis I, yaitu leptoten dengan ciri kromatin berpilin menjadi kromosom yang tampak sebagai benang panjang yang tunggal. Pada zigoten kromosom homolog dari jantan dan betina mulai berpasangan. Pada pakiten merupakan proses yang paling panjang, dimana kromosom makin memendek dan

menebal, inti makin membesar dan kromosom homolog sangat berdekatan membentuk synaptonemal complex yang memungkinkan terjadinya crossing over sehingga ada variasi keturunan. Bentuk pakiten yang khas terdapat pada stage VII sampai dengan XII. Pada diploten tiap kromosom membelah longitudinal tetapi masih tetap berhubungan dan akhirnya pada Diakinesis kromosom-kromosom memisah, nukleus hilang, membran inti hancur, sentriol mengganda dan setiap pasangan kromosom menuju ke kutub yang berseberangan dengan inti dan selanjutnya memasuki proses metafase, anafase dan telofase. Pembelahan spermatosit primer ini akan menghasilkan 2 spermatosit sekunder yang berkromosom haploid dengan kandungan DNA kromatid ganda (de Kretser, 1988). Segera setelah terbentuk spermatosit sekunder akan melanjutkan ke pembelahan meiosis yang kedua yang berlangsung sangat cepat. Berbeda dengan meiosis yang pertama, disini tidak didahului oleh profase dan tidak terjadi penggandaan DNA, serta terjadi reduksi dari DNA yang kromatid ganda menjadi kromatid tunggal. (dengan proses pembelahan sama dengan mitosis) membentuk spermatid haploid (Ross and Reith, 1985). Dengan tampaknya spermatid ini menandai dimulainya stage I dari siklus selanjutnya.

Spermatosit sekunder akan membelah menjadi 2 spermatid bulat. spermatid bulat ini tidak akan membagi diri lagi tetapi mengalami proses pematangan yang merupakan tahap perubahan bentuk/ metamorfosis dari spermatid bulat menjadi spermatozoa yang matang disebut proses spermiogenesis. Perubahan fase-fase perkembangan terbagi atas 19 langkah, ini dapat diamati dengan jelas dari sediaan yang dilakukan dengan pengecatan dengan iron-hematoxylin.

Pada akhirnya generasi terakhir spermatogonia (tipe B) akan masuk kedalam suatu masa intermetotik dengan sifat : mengalami pertumbuhan dan perubahan-perubahan didalam inti, sehingga terjadilah proses diferensiasi dari spermatogonia menjadi spermatosit primer yang masih tetap mempunyai 46 kromosom. Pada akhir masa pertumbuhan spermatosit primer terlihat bahwa kromosom yang sebelumnya panjang dan berbentuk seperti benang, selanjutnya menjadi tebal, pendek dan mengalami proses penggandaan (pairing) dari kromosom homolog sehingga kelihatan menjadi 23 pasang kromosom. Setelah membuat suatu duplikasi (replika) dari pada DNA, maka tiap anggota pasangan kromosom itu membagi diri menjadi suatu tetrad. Kromosom didalam tetrad ini mempunyai perbedaan dalam besar dan bentuk sehingga masing-masing dapat dibedakan. Kemudian kromosom menebal masuk kedalam tingkat spindle yang masing-masing tetap mempertahankan sifatnya sendiri-sendiri. Kromosom-kromosom yang telah mengadakan proses penggandaan pada waktu sinopsis akan mengalami pemisahan dimana tiap anggota dari pasangan kromosom akan bergerak ke arah salah satu dari dua spermatosit sekunder yang telah terbentuk itu. Berbeda dengan pembagian mitosis biasa, disini tiap sel spermatosit sekunder hanya menerima separuh jumlah kromosom. Proses ini disebut sebagai pembagian reduksi atau pembagian heterotipik.

Spermatosit primer berbentuk bulat dengan nukleus menunjukkan beberapa tahap pembelahan. Spermatosit sekunder berbentuk bulat dengan nukleus sentrik dan mengandung jala-jala kromatin. Ukuran spermatosit sekunder berada antara ukuran spermatosit primer dan spermatid.

2.3.2. Spermatid

Melalui suatu tingkat interfase yang singkat, maka tiap-tiap spermatosit sekunder yang telah terbentuk akan masuk kedalam proses pembagian pematangan kedua untuk menghasilkan dua sel spermatid. Dengan demikian maka dari tiap-tiap spermatosit primer akan terbentuk 4 spermatid, yang masing-masing mengandung kromosom dalam jumlah haploid (23 kromosom). Sehingga tiap inti spermatid mengandung hanya separuh jumlah DNA dibandingkan dengan jumlah DNA dalam inti spermatogonia.

Spermatid tahap awal berbentuk bulat dengan inti bulat terletak sentral dan pada perkembangan selanjutnya bentuk dan letak inti berubah, inti terletak eksentrik (de Kretser and Kerr, 1988). Spermatid yang baru terbentuk mempunyai sifat-sifat sebagai berikut :

- Intinya bulat, letaknya ditengah-tengah, pada pengecatan inti berwarna gelap
- Daerah golgi terdapat dekat pada inti dan berbatas jelas
- Mitokondria terdapat butir-butir dalam jumlah yang banyak tersebar pada bagian dalam selaput sitoplasma
- Sentriol kelihatan kecil.

2.4. Steroidogenesis

Steroidogenesis ialah proses sintesis steroid khususnya hormon testosteron dan derivatnya. Hormon steroid yang diproduksi oleh testis adalah androgen, sedangkan bagian terbesar dari androgen adalah testosteron. Secara

umum, androgen adalah hormon steroid yang mampu merangsang perkembangan serta mempertahankan fungsi normal dari organ reproduksi jantan.

Manfaat androgen terutama pada tahap pembentukan spermatogonia dan untuk pembelahan meiosis kedua yang membentuk spermatid.

Sejumlah steroid yang lain kecuali testosteron, adalah Androstenedion dan dihidroepiandrostenedion merupakan steroid antara dalam proses terbentuknya testosteron. Androgen lainnya adalah dihidrotestosteron (DHT) berperan amat penting terutama pada kelenjar asesori (Tjokronegoro, 1999)

Sel Leydig sangat berperan dalam memproduksi steroid. Didalam sel Leydig terdapat beberapa reseptor yang dapat menangkap hormon LH. Kolesterol merupakan bahan dasar testosteron didalam sel Leydig yang diangkut ke plasma sel untuk diubah menjadi testosteron. Didalam sel Leydig kolesterol akan diubah menjadi pregnenolone, kemudian pregnenolone membentuk Dehidroepiandrosteron (DHEA), atau progesteron, cortisol atau aldosteron. DHEA bisa diubah lagi menjadi androstenediol kemudian menjadi testosteron dan selanjutnya di baru bisa berefek di jaringan target bila oleh enzim 5α reduktase diubah menjadi Dihidrotestosteron (DHT). DHEA diubah oleh enzim 17β hidroksi steroid dihidrogenase menjadi Androstenedion (Speroff, 1994 ; de Kretser, 1995)

Di dalam plasma, testosteron ditemukan lebih banyak terikat dengan protein globulin yaitu sekitar 44 % sedangkan 54 % terikat dengan albumin dan yang bebas hanya 2 %. Ikatan dengan albumin ini kira-kira 1000 kali lebih lemah dari pada ikatan dengan globulin, tetapi oleh karena konsentrasi albumin jauh lebih besar dari pada Testosteron binding globulin (TeBG) maka kapasitas bindingnya menjadi sama. Didalam testis kadar testosteron didapatkan dalam

bentuk terikat dengan ABP sehingga testosteron dengan mudah memasuki sel target didalam tubulus seminiferus selanjutnya berperan pada proses meiosis pertama. Oleh karena itu bila ada gangguan testosteron akan terjadi hambatan pada proses meiosis. (Hafez, 1987).

Ikatan Testosteron dengan protein ini tidak langgeng, tetapi bisa dilepaskan (terurai) didalam kapiler-kapiler sehingga fraksi yang aktif lebih banyak dari pada fraksi yang bebas. Bioviabilitas testosteron kira-kira separuh dari jumlah totalnya. Testosteron disekresikan kedalam kapiler darah, limfe atau masuk ke tubulus seminiferus melalui sel peritubuler. Testosteron masuk ke sel Sertoli melalui transport aktif atau difusi bersyarat. Konsentrasi Testosteron dan Dihidrotestosteron jauh lebih besar dalam vena spermatika dibanding dengan didalam vena perifer diseluruh tubuh, mungkin karena dekat dengan sumbernya yaitu sel Leydig (Hadley, 1992)

Molekul Androgen Binding Protein mempunyai afinitas atau daya ikat yang tinggi terhadap hormon androgen terutama testosteron dan 5α dihidrotestosteron. Ikatan ABP-Androgen kompleks dibawa ke reseptor sitoplasma sel target (sel germinal). Melalui proses deionisasi androgen dibebaskan dari ikatan ABP-Androgen kompleks dan selanjutnya diikat oleh reseptor sitoplasma membentuk ikatan reseptor-androgen kompleks.

Meningkatnya sekresi ABP oleh sel Sertoli menyebabkan lebih banyak mengikat androgen (terutama testosteron dan 5α dihidrotestosteron) dengan demikian menyebabkan kadar androgen di tubulus seminiferus lebih tinggi sampai 50 kali dibanding dengan didalam darah. (terutama di bagian adluminal) sehingga memungkinkan proses spermatogenesis bisa berlangsung lebih baik.

Testosteron dalam melaksanakan fungsinya, berikatan dengan reseptor intraselular. Reseptor androgen berada didalam inti sel, terdiri dari rantai polipeptida tunggal. Testosteron didalam plasma 0,3 % mengalami aromatisasi menjadi estradiol dan 6,8 % diubah menjadi dihidrotestosteron oleh 5α reduktase. Ini yang menjadi metabolit aktif. Sedangkan 40 % dengan enzim 17β -OH steroid dihidrogenase menjadi 17 ketosteroid -Androstenedion dan Ethio cholanolone, yang 50 % mengalami hidroksilasi menjadi polar metabolit diols dan triols yang tidak aktif untuk dieskresikan (Simorangkir, 1997)

Testosteron ini berfungsi terhadap perkembangan sifat kelamin sekunder dan proses spermatogenesis (Ferdinandus, 1980).

Jika kadar testosteron cukup tinggi dalam sirkulasi darah, dapat memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi LH dan FSH. Didalam tubulus seminiferus, testosteron diperlukan untuk perkembangan sel spermatosit menjadi spermatid (Noris, 1980), untuk proliferasi dan diferensiasi sel spermatogenik (Ross and Reith, 1985), tahap awal atau akhir spermatogenesis (Hadley, 1992) dan pada tahap spermiogenesis (Ganong, 1993)

Penurunan kadar testosteron didalam tubulus seminiferus akan menyebabkan terjadinya gangguan saat meiosis pertama yaitu terbentuknya sel spermatosit sekunder yang akhirnya gangguan terbentuknya spermatid (Suhadi, 1989)

Pada percobaan dengan penyuntikan Ethanodimethylsulfonate (EDS) untuk merusak aliran darah dalam testis, didapatkan jumlah polimorfonuklear leukosit dan sel Leydig berkurang. Dengan menginjeksikan testosteron pada dosis tertentu maka aliran darah ke-testis kembali normal dan jumlah sel-sel kembali pulih.

Sehingga disimpulkan testosteron mempunyai peran fisiologis untuk menjaga peredaran darah mikrosirkulasi didalam testis (Damber et al., 1992)

2.5. Sistem imun tubuh

Sistem imun tubuh terdiri atas berbagai macam sel dan molekul protein yang saling bekerja sama, mulai dari pengenalan antigen asing (*non-self antigen*) hingga bangkitnya respon imun dan terbentuknya antibodi maupun sel makrofag aktif.

Didalam tubuh terdapat kumpulan jaringan, beberapa sel dan molekul yang dikelompokkan didalam sistem imun tubuh dan berfungsi menjaga keseimbangan homeostasis dan pertahanan tubuh terhadap mikroba patogen dan bahan-bahan asing yang masuk kedalam tubuh serta bertindak sebagai sistem perondaan terhadap terjadinya mutasi sel tubuh.. Tanggapan yang diberikan oleh sistem ini terhadap substansi asing yang masuk tubuh dinamakan respon imun (Staines, 1993).

Sistim imun dibedakan menjadi dua yaitu, pertama : natural / alamiah atau non-spesifik dan sering juga dikenal dengan istilah *innate immunity*. system imun alamiah bekerja secara spontan terhadap substansi asing , tanpa memerlukan pengenalan terlebih dahulu, tidak diskriminasi terhadap substansi asing dan tidak membentuk sel memori. Kedua ialah sistem imun spesifik yang dapat mengenal substansi asing secara spesifik dan mengeliminasi benda asing secara selektif. Ciri khas dari sistem imun ini adalah adanya: spesifisitas, diversitas, terbentuknya sel memori dan mampu membedakan self dan non-self. Ketahanan tubuh yang

diperoleh melalui sistem imun ini dinamakan imunitas spesifik/ *acquired immunity* (Baratawidjaya, 1991)

Yang tergolong dalam imunitas natural atau non spesifik diantaranya adalah: pertahanan anatomik seperti : air liur, air mata, sekresi mukus.

- pertahanan fisiologis seperti : pH lambung, lisosim, komplemen,
- pertahanan melalui fagositik/ endositik oleh sel neutrofil, eosinofil dan makrofag
- Pertahanan melalui respon inflamasi
- Sitotoksitas oleh sel natural killer (NK)
- mediator aktif yang larut seperti interferon beta, tumor necrosis factor, suatu sitokin yang dilepas oleh sel makrofag.

Yang digolongkan dalam imunitas spesifik adalah populasi limfosit T dan limfosit B bersama dengan sel penyaji antigen (*antigen presenting cell*).

Komponen pertama sistem imunitas spesifik ini ialah imunitas humoral yang dibawakan oleh sel B. Sedangkan komponen kedua ialah imunitas selular yang dibawakan oleh sel T. Kedua sistem imunitas ini dibentuk dari sistem hemopoetic stem cell, suatu sumber yang sama untuk sel darah merah. Dalam perkembangan dan diferensiasi stem cell selanjutnya menjadi sel limfoid, ia akan dipengaruhi oleh *bursa fabricius* pada burung atau *gut associated lymphoid tissue* pada manusia, sehingga sel tersebut menjadi sel limfosit yang kompeten sebagai mediator imunitas humoral. Sel semacam ini dikenal dengan nama limfosit B (sel B). Sel ini umumnya berukuran medium dan ada pula yang besar. Sebaliknya apabila *stem cell* tersebut dipengaruhi oleh kelenjar thymus atau cairan sekresinya, yaitu thymosin, maka sel limfoid akan berkembang dan berdeferensiasi menjadi

sel yang kompeten sebagai mediator imunitas selular. Sel semacam ini dikenal dengan nama limfosit T (sel T), dimana sel ini pada umumnya berukuran kecil.

Walaupun sistem limfosit B dan T ini dapat melakukan tugasnya secara terpisah, yang satu memproduksi antibodi sedangkan yang lain melepaskan limfokin (sitokin), namun mereka sering kali bekerjasama menghadapi antigen asing yang masuk tubuh. Apabila sel monosit atau makrofag telah memfagosit suatu antigen asing, sebagai manifestasi proses imunitas nonspesifik, maka pada waktu terjadi penghancuran intraselular oleh beberapa enzim proteolitik, antigen tersebut akan dipresentasikan dipermukaan monosit/ makrofag bersama molekul MHC dan akan dikenali oleh limfosit T melalui T cell receptor (TCR) sekaligus dipersiapkan untuk menjadi suatu super antigen, yaitu antigen yang sifat imunogeniknya bertambah besar. Langkah berikutnya adalah terjadinya kontak antara makrofag dengan limfosit T maupun limfosit B. Pada pertemuan ini terjadi presentasi super antigen, sehingga antigen itu segera dikenal oleh sistem imunitas yang spesifik sebagai antigen asing. Limfosit T jenis helper cell akan membantu limfosit B, sehingga lebih efektif dalam proses pengenalan zat antigenik tersebut. Limfosit B kemudian berkembang menjadi sel plasma yang akan mensintesis antibodi. Limfosit T jenis sitotoksik akan berdeferensiasi menjadi sel yang mampu mengadakan penyerangan ke organ target, sedangkan limfosit T yang lain berubah menjadi limfosit yang secara spesifik akan menghasilkan berbagai zat mediator imunitas selular, yaitu zat limfokin (sitokin). Didalam tubuh terdapat empat jenis limfosit T dengan fungsi yang berbeda-beda yaitu : limfosit T helper, limfosit T supressor, limfosit T sitotoksik dan limfosit T yang melepaskan mediator sitokin tersebut (Tjokronegoro, 1999)

Didalam jaringan interstisial pada testis, selain terdapat pembuluh darah, syaraf, jaringan ikat, terdapat juga sel khusus disebut sel Leydig dan beberapa macam sel lain, seperti makrofag, limfosit, sel mast dan sel darah putih yang lain (Beckerman,1997).

Sel makrofag, lymfosit dan sel darah putih yang lain ini dinamakan sel imunokompeten yang memproduksi sitokin antara lain TNF- α . Sel ini secara ultra struktural dan fungsional sama dengan komponen sistem imun yang berada di jaringan tubuh yang lain. Makrofag dan sel mast yang menetap di jaringan interstitial, mensekresi sitokin yang berinteraksi dengan sel Leydig, sel Sertoli dan sel germinal pada tubulus seminiferus (Robertson et al., 1993 ; Morrissette et al., 1999)

2.5.1. Sel-sel fagosit

Sel-sel fagosit adalah kelompok sel yang berfungsi melakukan fagositosis terhadap benda asing yang menginvasi tubuh. Secara umum sel-sel fagosit dibagi dalam dua grup, yaitu sel fagosit mononuklear dan sel granulosit (polimorf nuklear). Sel fagosit mononuklear yang terdapat didalam sirkulasi darah dinamakan monosit dan yang berada dalam jaringan atau organ tubuh disebut makrofag. Dahulu sel fagosit mononuklear ini dikelompokkan dalam suatu sistem yang dikenal dengan nama RES (reticoendothelial system), tetapi sekarang dikelompokkan dalam sistem fagosit mononuklear (Mononuclear phagocyte system = MPS). Sel-sel granulosit dikenal juga sebagai sel-sel inflamasi yang fungsi utamanya adalah memfagosit mikroba atau makromolekul asing yang masuk dalam tubuh, jadi disini berperan dalam sistem imun non spesifik.

Apabila mikroorganisme asing berhasil difagosit, maka didalam sel tersebut terjadi proses "*killing*", sehingga kuman-kuman penyakit menjadi mati. Apabila bakterinya termasuk golongan intraselular, maka infeksiya biasanya menjadi kronik, karena tidak segera dapat dibunuh oleh leukosit maupun oleh makrofag yang biasa, maka lewat sistem imunitas selular sel makrofag akan mengalami suatu perubahan sehingga menjadi *activated makrophage* (makrofag teraktivasi), yang mempunyai granula-granula lisosom yang lebih banyak dan lebih mampu meningkatkan "*daya killingnya*" (Tjokronegoro, 1999)

Pada proses imunologi selanjutnya oleh karena aktivasinya dirangsang oleh sitokin yang dilepas oleh sel limfosit T atau oleh antibodi dalam proses opsonisasi seperti halnya yang terjadi pada makrofag yang bisa bertindak reaksi imun spesifik atau reaksi imun nonspesifik, maka sel granulosit juga berperan dalam respon imun spesifik. Yang termasuk sel granulosit adalah : sel neutrofil, sel eosinofil dan sel basofil. Sel makrofag jaringan memegang peranan penting dalam memproduksi sitokin (Moore et al.,1994).

Fagositosis badan residu (residual bodies) akan memicu sel Sertoli untuk memproduksi IL-1 yang secara autokrin akan mempengaruhi spermatogenesis (Wang et al., 1998)

2.5.2. Sitokin

Sitokin adalah substansi atau mediator yang dihasilkan oleh sel dalam memberikan reaksi radang atau imunologik yang berfungsi sebagai isyarat antara sel untuk mengatur respon setempat atau secara sistemik. Sitokin dapat

mempengaruhi peradangan dan imunitas melalui pengaturan pertumbuhan, mobilitas dan diferensiasi leukosit dan beberapa sel jenis lain. Sitokin dapat mengaktifkan sel lain atau membentuk molekul yang mengendalikan sistem imun dan merangsang secara alamiah. Sitokin dibuat secara *de novo* setelah sel penghasilnya mendapatkan rangsangan. TNF- α yang disekresi oleh makrofag dan sel jenis lain memiliki berbagai aktivitas biologis terhadap sel sasaran baik yang termasuk dalam sistem imun maupun bukan. Sebenarnya sitokin terdiri atas sejumlah faktor yang dapat memperlihatkan aktivitas biologisnya yang spesifik. Berbagai sel efektor dalam sistem imunitas selular ini, setelah dipengaruhi oleh sitokin akan berubah dan melaksanakan fungsinya sesuai dengan peranan faktor-faktor tersebut. Misalnya sel makrofag setelah dipengaruhi oleh *makrophage activating factor* (MAF) akan segera menjadi aktif, bahkan ganas untuk membasmi sel asing. Sifat penyerangan sel makrofag ini ternyata tidak spesifik, artinya akan dapat menyerang berbagai jaringan baik yang normal maupun yang abnormal. Sel makrofag yang telah aktif ini selanjutnya dapat melepaskan suatu mediator lain termasuk sitokin, interleukin 1 (IL-1) dan lain-lain (Ma'at, 1997)

Menurut Huleihel et al.(1996), sitokin adalah kumpulan dari imunoregulator, *polypeptide growth factors* yang diproduksi oleh bermacam-macam sel secara luas. Sitokin inflamasi IL-1, IL-6, GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) dan TNF- α diproduksi terutama oleh makrofag terhadap respon dari antigen asing, infeksi pathogen dan aktivasi imunologik

Makrofag berperan besar dalam mengawali dan mengatur respons imun. Peran tersebut berlangsung dalam memproses dan menyajikan antigen kepada limfosit dan dalam kemampuannya menghasilkan interleukin-1 (IL-1) agar limfosit tersebut menerima sinyal, yang selanjutnya menjadi aktif. Untuk peran tersebut diperlukan pengenalan antigen Human Leucocyte Antigen (HLA) yang sama (Subowo, 1993).

IL-1, sebagai mediator yang penting dalam proses peradangan dan dapat berperan dalam aktivitas imunologik. Pengaruh IL-1 terhadap imunitas adalah terutama berfungsi sebagai pendorong terhadap diferensiasi limfosit T (Subowo, 1993)

TNF- α , walaupun dalam beberapa aktivitas biologik mirip dengan IL-1, namun ada beberapa perbedaan dalam pengaturan sistem imun. Secara umum nampak bahwa TNF tidak banyak terlibat dalam pengaturan tersebut. TNF mempunyai aktivitas perangsangan yang ganda terhadap limfosit T teraktifkan (*activated lymphocyte*), misalnya respons proliferasi terhadap antigen. Demikian juga imunitas spesifik terhadap tumor ditingkatkan oleh TNF. Telah diketahui bahwa TNF mempengaruhi peningkatan aktivitas limfosit B dan mempunyai efek perlindungan non spesifik terhadap patogen, misalnya aktivitas antivirus dan beberapa parasit.

Gene untuk TNF- α terdapat pada lengan pendek kromosom nomor 6 yang diduga didekat atau dalam kompleks Human leucocyte antigen (HLA). TNF- α manusia memiliki homologi sebesar 80 % dengan TNF- α mencit dan 28 %

dengan limfotoksin. Limfotoksin yang mempunyai mekanisme kerja dan reseptor yang sama dengan TNF disebut TNF β . IL-6 mempunyai kaitan dengan IL-1 dan TNF- α , karena ketiga sitokin ini dapat dihasilkan oleh sel makrofag secara terkoordinasi. Sebaliknya produksi IL-1 dapat dihambat oleh inhibitor yang dilepaskan oleh makrofag sendiri. Kaitan ketiga sitokin tersebut juga disebabkan oleh karena masing-masing dapat saling menginduksi pelepasannya, misal IL-1 atau TNF- α dapat menginduksi IL-6 dan sebaliknya. (Subowo, 1993)

Tumor Necrosis Factor (TNF) dulu dikenal dengan nama limfotoksin. Sumber utama TNF adalah sel fagosit mononuklear yang dapat diaktivasi dengan lipopolisakarida (LPS). Sumber yang lain adalah sel T yang dirangsang antigen, Natural Killer cell (sel NK) aktif dan sel mast aktif. TNF adalah suatu mediator untuk imunitas spesifik, disamping itu juga merupakan mediator yang penting untuk menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut. Dalam dosis rendah TNF bertindak sebagai regulator parakrin dan otokrin dari leukosit dan sel-sel endotelial. Kerja biologis TNF adalah menyebabkan sel endotel mengekspresikan reseptor permukaannya yang baru (adhesion molekul), sehingga mengakibatkan sel permukaan endotelial menjadi adhesif terhadap leukosit terutama neutrofil, monosit dan limfosit. Hal ini mendukung terjadinya penumpukan sel-sel leukosit ditempat terjadinya inflamasi. TNF sangat poten dalam mengaktivasi sel-sel neutrofil, tetapi juga berefek terhadap eosinofil dan sel fagosit mononuklear. TNF juga merangsang sel fagosit mononuklear dan sel tipe lain untuk memproduksi sitokin, seperti IL-1, IL-6 dan TNF sendiri.

Efek IL-6, terhadap sejumlah sel sasaran sangat beragam. Efek ini juga dimiliki oleh IL-1 dan TNF sehingga IL-6 dianggap sebagai mediator peradangan sebagai sistem imun yang utama. Disamping dihasilkan oleh makrofag, IL-6 juga dihasilkan oleh jenis sel lain, seperti limfosit T, fibroblas dan sel tumor, maka IL-6 digolongkan pula sebagai limfokin. IL-6 merupakan interleukin yang berfungsi sebagai penghubung antara sejumlah jenis sel dengan cara berperan dalam mendorong proliferasi dan diferensiasi limfosit B, limfosit T dan sel induk darah (stem cell).

Dalam saluran reproduksi, leukosit selalu tetap siaga, berusaha mencegah dan bahkan menyerang dan menghancurkan setiap benda asing yang masuk tubuh. Dalam penyerangan ini leukosit juga mengeluarkan interleukin yang bisa menghancurkan sel sperma pada gangguan imunologis seperti reaksi auto-imun, sehingga sperma dianggap sebagai benda asing oleh tubuh, biasanya sperma tersebut keluar dari sistem oleh karena rusaknya blood testis barrier dan kontak dengan komponen darah.

2.6. Sistem imun pada mencit

Ada beberapa alasan digunakannya mencit sebagai hewan percobaan :

- Ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis seperti pada penelitian ini belum pernah dicoba diteliti pengaruhnya pada organ reproduksi jantan, oleh karena itu bila ada efek yang negatif, apalagi yang bersifat menetap akan sangat merugikan orang tersebut, juga mengambil testis dan menimbanginya

kemudian membuat sediaan histologis tidaklah mungkin dilakukan pada manusia, maka peneliti memilih untuk mencobanya lebih dahulu pada mencit.

- Mencit mempunyai tubuh kecil sehingga tidak banyak memerlukan ruang pemeliharaan dan konsumsi makanan.
- Mencit mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan sekitar.
- Harganya murah, mudah didapat dan cukup jinak sehingga pemberian perlakuan dapat dilakukan dengan mudah sesuai dengan rencana.
- Testis mencit mempunyai struktur histologis yang mirip dengan testis manusia
- Banyaknya peneliti yang memakai hewan ini sebagai hewan percobaan, termasuk juga tentang uji biologik pengaruh hormon pada sistem reproduksi mencit. Tersedia pustaka tentang mencit sehingga sangat memudahkan dalam menjelaskan landasan teori dan perubahannya.
- Sistem imun mencit telah banyak diketahui dibandingkan dengan sistem imun hewan percobaan yang lain.

Dengan telah ditemukan konsep seluler untuk membedakan subpopulasi sel-T pada mencit, hewan coba ini digunakan sebagai model dalam penelitian sistem imun seluler pada manusia.

Antigen permukaan sel limfosit mencit yang pertama kali ditemukan, adalah antigen Theta yang kemudian dikenal dengan nama Thy-1. Antigen ini hanya didapat pada sel T, tidak pada sel B. Sedangkan Antigen yang didapat pada semua sel limfosit mencit adalah Ly, dimana Lyt pada sel T dan Lyb pada sel B. Antigen inilah yang digunakan untuk membedakan subpopulasi limfosit mencit (Maat, 1997)

Didalam jaringan interstisial, dapat ditemukan beberapa macam sel lain, seperti : sel fibroblas, sel mast , sel darah putih yang lain terdapat juga residen makrofag dalam jumlah yang besar yang peran fisiologisnya telah diketahui yaitu kapasitasnya memproduksi IL-1, il-6, TNF- α dan GM-CSF. Untuk menyelidiki fungsi dari testikular makrofag tersebut telah dianalisa sekresinya yaitu IL-1, IL-6, TNF- α dan GM-CSF dengan menggunakan spesifik bioassay yang biasa digunakan untuk mengukur kapasitas sitokin-sitokin tersebut. Pada penelitian ini dibandingkan antara makrofag yang berasal dari testis dan makrofag yang berasal dari peritonium. Basal produksi basal untuk IL-1, il-6, TNF- α antara makrofag intratestikular dan makrofag dari peritonium adalah sama. Tetapi testikular makrofag memproduksi 8 kali lipat GM-CSF dibanding makrofag dari peritonium. Peran fisiologis ini memberi kontribusi yang penting pada aktivitas imunologi yang mendasari pemikiran tentang status khusus imunologi testis pada eaksi imun patologis yang masuk (Kern et al., 1995).

Pada waktu terjadi infeksi pada organ genetalia, nampak jelas ekspresi kadar sitokin pada plasma semen. Sitokin tersebut mungkin mempengaruhi fungsi sperma sehingga berpengaruh pada kesuburannya (fertilitas). Pada penelitian ini peningkatan produksi sitokin tersebut terjadi pada glandula asesori, tidak ada kaitannya dengan spermatogenesis (Huleihel et al, 1996)

Sitokin IL-1 terdapat dalam jumlah yang besar pada testis tikus yang aktivitasnya cenderung pada proliferasi sel selama spermatogenesis (Khan et al. 1987)



Sitokin IL-1 juga diproduksi oleh sel Sertoli dan sel germinal tikus yang mempunyai peran dalam regulasi autokrin dan parakrin pada proses spermatogenesis (Wang et al.1998)

Dwight et al. (1990) pada penelitiannya, bahwa TNF - α dan IL-1 meningkatkan produksi testosteron pada testis tikus dewasa yang telah diuraikan jaringannya dan pada sel Leydig yang dimurnikan.

2.7. Imunomodulator

Imunomodulator adalah obat-obatan yang secara langsung memodifikasi fungsi imun, mempunyai efek positif artinya mampu meningkatkan fungsi dan aktivitas komponen sistem imun atau efek negatif artinya mampu menekan fungsi dan aktivitas komponen sistem imun (Ma'at, 1997). Dengan demikian semakin banyak diketahuinya mekanisme sistem imun sampai pada tingkat molekular, pendekatan imunomodulasi semakin terarah, lebih spesifik dan lebih berdaya guna. Mekanisme imunomodulasi ditujukan terhadap hampir semua sel-sel imunokompeten, tetapi kenyataannya sementara ini lebih banyak ditujukan terhadap respon imun non spesifik. Walaupun demikian untuk mendapatkan imunomodulator yang spesifik sudah banyak mendapatkan hasil dan sudah banyak pula yang digunakan diklinik .

Berdasarkan mekanisme kerjanya, imunomodulator dibagi menjadi dua yaitu pertama imunomodulator adalah bahan-bahan yang dapat meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun dikenal dengan imunostimulator, kedua adalah bahan-bahan yang dapat menekan fungsi dan aktivitas sistem imun baik terhadap

sistem imun normal atau sistem imun yang terganggu dikenal dengan immunosupresor

Berdasarkan jenis bahannya, imunomodulator digolongkan dalam :

(a) imunomodulator spesifik

Dari golongan imunomodulator spesifik ini yang paling banyak digunakan adalah golongan sitokin, misalnya : interferon, interleukin, CSF (colony-stimulating factor), Tumor necrosis factor (TNF), dan golongan antibodi monoklonal. Golongan ini dikenal juga sebagai imunoregulator.

(b) Imunomodulator non-spesifik

Dari golongan ini dapat digolongkan lagi berdasarkan asal produknya, yang berasal dari produk mikroba, contohnya *Bacillus calmette-Geurin* (BCG), Bestatin, endotoxin. Yang berasal dari mamalia, contohnya : Thymosin, thymomodin. Yang berasal dari bahan sintesis, contohnya : cimetidin, levamisol (Tjokronegoro, 1999).

Khusus untuk imunostimulator yang berasal dari tanaman, sekarang sudah banyak yang diteliti dan sudah banyak yang digunakan dalam pengobatan, contohnya aurixor, berasal dari tanaman mistelkraut (semacam benalu) untuk pengobatan kanker.

2.8. Tinjauan tentang tanaman *Phyllanthus niruri* L

2.8.1. Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotylae

Sub kelas	: Monoclamidae / Apetalae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku (familia)	: Euphorbiaceae
Marga (genus)	: <i>Phyllanthus</i> LINN
Jenis (species)	: <i>Phyllanthus niruri</i> LINN

2.8.2. Nama daerah

Jawa	: meniran / meniran ijo
Sunda	: memeniran

2.8.3. Pertelaan / Morfologi

Perdu, tumbuh tegak, tinggi 50 cm sampai 1 meter, bercabang terpenjar, cabang mempunyai daun tunggal berseling dan tumbuh mendatar dari batang pokok. Batang berwarna hijau pucat dan hijau kemerahan, bentuk daun bundar telur sampai bundar memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bundar atau runcing, permukaan daun bagian bawah berbintik-bintik. Bunga keluar dari ketiak daun, bunga jantan terletak dibawah ketiak daun, berkumpul 2-4 bunga, gagang bunga 0,5 - 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur terbalik, panjang 0,75 - 1 mm, berwarna pucat. Bunga betina letaknya diatas permukaan atas ketiak daun, gagang bunga 0,75 - 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bundar telur sampai bundar memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25 - 2,5 mm. Buah licin, garis tengah 2 -2,5 mm, panjang gagang buah 1,5-2 mm.

Ekologi penyebaran, tumbuh tersebar hampir diseluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 - 1000 meter diatas permukaan air laut. Tumbuh liar ditempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai dan di pantai

Budidaya :Belum dibudidayakan secara teratur. Tumbuhan ini merupakan gulma yang tumbuh secara liar pada tempat yang lembab dan berbatu. Pemerian simplisia : Bau aromatik ; rasa pahit.

2.8.4. Kegunaan tanaman

Pada penelitian Ma'at, 1997 pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L per-oral pada mencit menunjukkan pengaruhnya pada fungsi dan aktivitas sistem imun yaitu sebagai imunostimulator, efek stimulator ini tampak pada meningkatnya sekresi beberapa sitokin oleh sel-sel imunogenik, sitokin tersebut antara lain ialah TNF- α oleh subset Th-1 TNF- α dapat mengaktivasi monosit / makrofag untuk melepas IL-1, IL-6 dan TNF- α itu sendiri.

Sebagai imunostimulator, ekstrak *Phyllanthus niruri* L telah banyak digunakan dalam pengobatan ajuvan terhadap infeksi virus hepatitis B. Juga diketahui secara invivo pengaruhnya terhadap peningkatan aktivitas fagositosis dan kemotaksis monosit atau makrofag. (Maat, 1997).

2.8.5. Kandungan tanaman / isi simplisia

Kandungan kimia dari *Phyllanthus niruri* L dapat berupa flavonoid yang terdiri dari guercetrin, quercitrin, iso quercitrin, astragalinalin, rutin, kaempferol-4-Rhamnopyranoside, erydictyol-7-rhamnopyranosid, festin-4-o-glucoside dan

nirurin ; lignan yang terdiri dari phyllanthin, hypphyllanthin dan triterpene lup-20(29)-en-3-ol. Alkaloid yang diberi nama ent-norcecurinin.

Terakhir ditemukan lagi lignan dan isolignan yang baru seperti : linteralin, isolinteralin, nirteralin, nirphyllindan phyllnirurin

2.8.6. Efek imunostimulator *phyllanthus niruri* L

Dari hasil penelitian dasar Ma'at, 1997, bahwa *Phyllanthus niruri* L berkhasiat sebagai imunostimulator pada mencit dan diharapkan memiliki manfaat klinik sebagai ajuvan dalam pengobatan penyakit infeksi bakteri intraseluler, infeksi bakteri ekstraseluler, infeksi virus, infeksi parasit, tumor dan penyakit-penyakit lain yang penyembuhannya dapat dilakukan dengan cara manipulasi sistem imun serta diharapkan mempunyai aspek klinis yang luas (Ma'at, 1997)

2.8.7. Pengaruh *Phyllanthus niruri* L pada proses spermatogenesis dan steroidogenesis

Pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan kemotaksis *in vivo* monosit / makrofag dan dapat meningkatkan sekresi TNF- α oleh subset T helper -1, selanjutnya TNF- α dapat mengaktifasi komponen sistem imun monosit/makrofag untuk melepas IL-1, IL-6 dan TNF- α sendiri. Oleh karena pemberian per-oral *Phyllanthus niruri* L dapat menstimulir sekresi TNF- α oleh subset Th-1 (Ma'at, 1997), sehingga diperkirakan akan mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten dalam testis terutama monosit/ makrofag, yang selanjutnya akan mempengaruhi proses spermatogenesis , efek semacam ini dapat dimanfaatkan untuk pengembangan ilmu kesehatan reproduksi.

Suatu studi serial menunjukkan bahwa TNF- α yang diproduksi oleh makrofag mampu mempengaruhi sel Leydig dalam memproduksi testosteron (Hutson, 1993).

Selanjutnya TNF- α mempunyai dua peran penting dalam mekanisme pengaturan hormonal dalam testis. Pada sel Leydig TNF- α menghambat Lutinizing hormone (LH) dengan menginduksi produksi testosteron oleh sel Leydig, dan menghambat Follicle Stimulating Hormone (FSH) dengan menginduksi produksi inhibin oleh sel Sertoli (Benahmed, 1997)

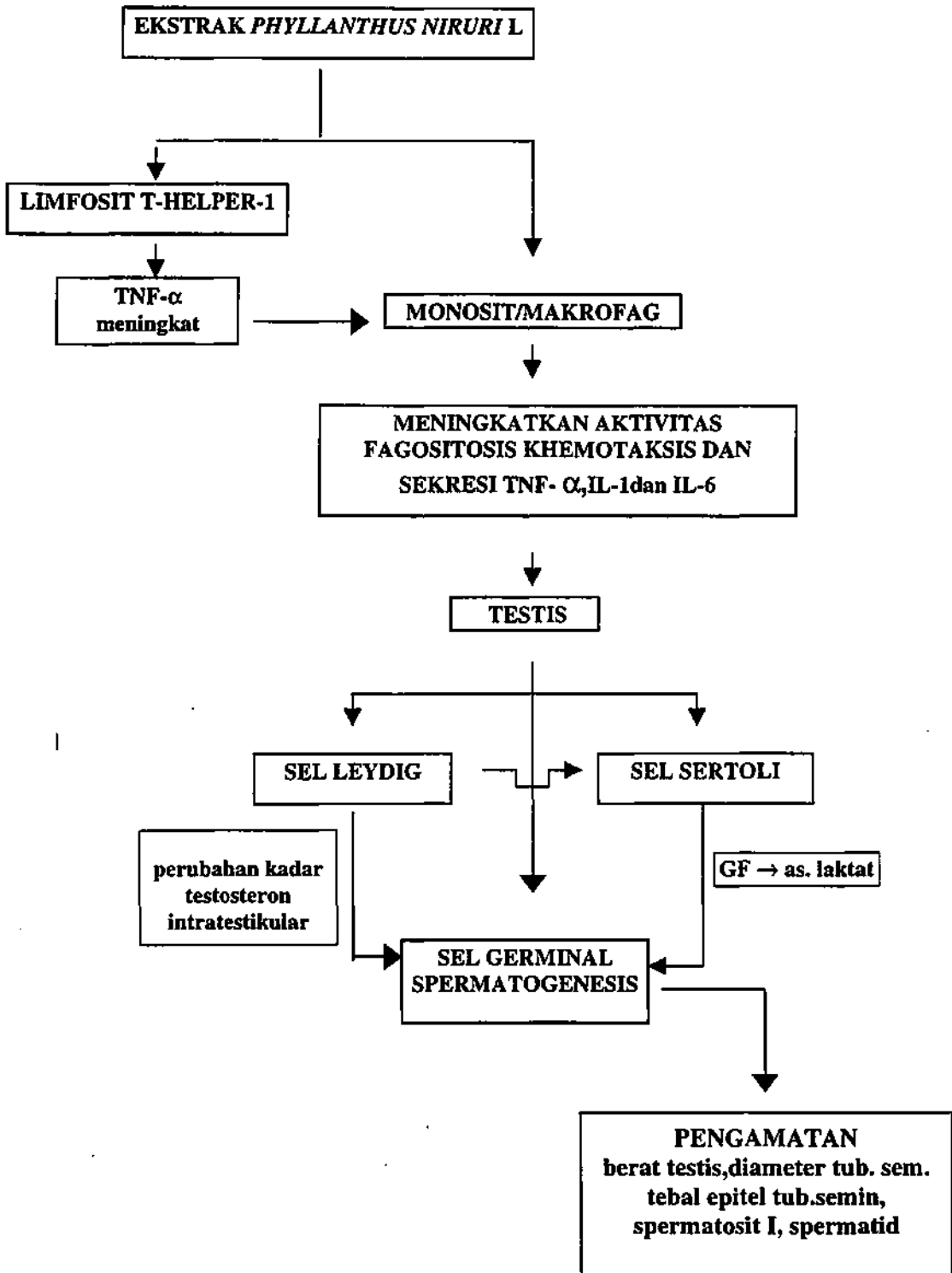
menunjukkan bahwa TNF- α dapat menghambat produksi testosteron oleh sel Leydig secara dosis dependen

- 3.1.6.** Kretser (1995), testis mempunyai dua fungsi penting yaitu fungsi spermatogenesis yang memproduksi spermatozoa dan fungsi steroidogenesis yang memproduksi testosteron. Sel Leydig dalam jaringan interstisial testis, diketahui mampu memproduksi testosteron. Testosteron ini pada individu jantan diperlukan untuk perkembangan tanda kelamin primer dan sekunder serta proses spermatogenesis. Perubahan kadar testosteron dalam testis diketahui dapat menyebabkan perubahan pada proses spermatogenesis.
- 3.1.7.** Nehar et al (1997), TNF- α meningkatkan aktivitas asam laktat dehidrogenase yang mengubah asam piruvat menjadi asam laktat. Didalam tubulus seminiferus TNF- α memberikan *signal* kepada sel germinal untuk meningkatkan produksi asam laktat melalui sel Sertoli. Asam laktat dipergunakan untuk energi metabolisme sel germinal.
- 3.1.8.** Benahmed (1997), dalam gonad TNF- α disekresi oleh makrofag jaringan interstisial dan oleh sel germinal dalam tubulus seminiferus.
- 3.1.9.** Wang et al.,(1998) sitokin IL-1 juga diproduksi oleh sel Sertoli dan sel germinal tikus yang mempunyai peran dalam regulasi autokrin dan parakrin pada proses spermatogenesis
- 3.1.10.** Robertson et al., (1993) ; Morrisette et al.,(1999) Makrofag jaringan interstitial testis yang secara ultrastruktural sama dengan makrofag sistemik juga mampu menghasilkan sitokin terutama TNF- α , IL-1 dan IL-

6 yang mempengaruhi sel Leydig, sel Sertoli dan sel germinal sehingga berpengaruh pada proses steroidogenesis dan spermatogenesis

3.1.11. Simorangkir et al.,(1997), mengamati proses spermatogenesis secara langsung yaitu menghitung jumlah spermatosit primer, spermatid, mengukur diameter dan tebal epitel tubuli seminiferi juga mengamati secara tidak langsung dengan mengukur berat testis, dengan menggunakan skala rasio

3.2. Kerangka konseptual



3.3. Hipotesis penelitian yang akan diuji dan hasil yang diharapkan, serta penerapan praktisnya.

Permasalahan utama disini adalah:

Seperti sudah ditulis pada latar belakang masalah, bahwa tanaman *Phyllanthus niruri* L sudah banyak digunakan pada pengobatan imunostimulator dalam jangka panjang, tetapi belum diketahui efeknya pada organ reproduksi pada umumnya dan organ reproduksi pria pada khususnya.

Pernah dilakukan penelitian mengenai pengaruh sitokin dan sel monosit/makrofag sebagai salah satu sumber sitokin terhadap organ reproduksi mencit jantan yang masing-masing peneliti memberikan hasil yang berbeda-beda, ada yang menghambat, merangsang atau tidak berpengaruh terhadap steroidogenesis dan spermatogenesis.

Yang ingin diketahui adalah : apakah pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada beberapa dosis tertentu selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) akan mempengaruhi proses spermatogenesis mencit ? dalam hal ini terwakili oleh berat testis, jumlah spermatosit primer, jumlah spermatid, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus. Apakah dengan peningkatan dosis tersebut akan semakin menghambat atau semakin merangsang ?. Sehingga dengan demikian kita akan mengetahui kegunaan ekstrak tanaman ini pada bidang ilmu kesehatan reproduksi. Apabila didapatkan hasil hambatan pada proses spermatogenesis maka kemungkinan kelak bisa dikembangkan sebagai obat kontrasepsi pria atau harus berhati-hati pada penggunaan ekstrak tanaman ini sebagai imunostimulator pada pasangan yang kurang subur, tetapi bila

pengaruhnya merangsang spermatogenesis maka terbukalah penelitian lebih lanjut penggunaan ekstrak tanaman ini untuk gangguan proses spermatogenesis.

Penulis membatasi penelitian ini pada akibat akhir yang ditimbulkan ekstrak tanaman ini pada organ reproduksi khususnya testis, karena testislah organ yang paling penting dalam sistem reproduksi jantan, tidak diteliti zat antara yaitu sitokin atau salah satu sel penghasilnya yaitu monosit/ makrofag karena mahalnnya biaya dan masih sulitnya mendapatkan kit untuk itu.

Untuk itu penulis akan menyusun sebuah hipotesis sebagai berikut:

Pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada mencit jantan (*Mus musculus*) secara per-oral pada beberapa dosis akan mempengaruhi spermatogenesis yang diwakili oleh variable :

- a. Berat testis
- b. Diameter tubulus seminiferus
- c. Tebal Epithel tubulus seminiferus
- d. Spermatisit primer
- e. Spermatisid.

BAB 4

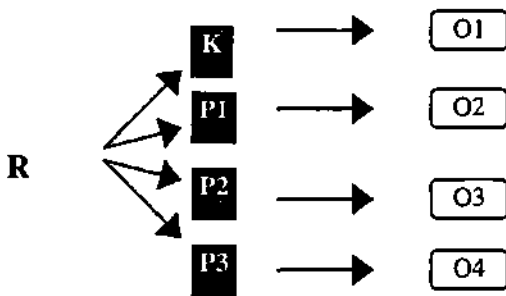
METODE PENELITIAN

4.1. Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah Experimental yang dilakukan di Laboratorium.

4.2. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian adalah: *Randomised, The post test only control-group design*, dengan, menggunakan derajat kemaknaan 0,05



- R = randomisasi, mencit dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dipilih secara acak
- K = sampel mencit kelompok kontrol, diberi pelarut (garam fisiologis) 0,1 ml / hari selama 54 hari
- P 1,2,3 = perlakuan; pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 2mg, 4 mg, 8 mg/ 0,1 ml / hari selama 54 hari
- O 1 = observasi dalam kelompok kontrol
- O 2,3,4= observasi dalam kelompok perlakuan, setelah perlakuan

4.3. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di :

Laboratorium RS. Petrokimia Gresik, Jl. A.Yani 59 Gresik.

Laboratorium Pathologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Laboratorium Biologi Reproduksi Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam , Universitas Airlangga Surabaya.

Waktu penelitian dilakukan mulai bulan April sampai dengan bulan juli 2000

4.4. Populasi sampel dan besar sampel

4.4.1. Sampel penelitian

Digunakan mencit putih jantan (*Mus musculus*) galur BALB/ c yang diperoleh dari kandang hewan percobaan Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma), Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian R.I., jalan A. Yani 68-70 Surabaya.

Digunakan mencit jantan dewasa umur 50 ± 10 hari, berat badan 20-25 gram dengan alasan secara seksual mencit telah dewasa (*sexual mature*) dan perubahan berat badan selama proses penelitian relatif kecil (Hume, 1972).

4.4.2. Estimasi besar sampel

Rumus : $(n - 1)(r - 1) \geq 15$ (Lameschow et al. 1990)

n = Jumlah sampel = 6

r = Jumlah replikasi/ perlakuan = 4

Faktor koreksi : $f = 0,1$

$$\frac{1}{1 - f} \times n \rightarrow \frac{1}{1 - 0,1} \times 6 = 7 ; \text{ sehingga jumlah sampel menjadi } = 6 + 1 = 7$$

4.4.3. Tehnik pengambilan sampel

Digunakan metode *simple random sampling*, dengan alasan : walaupun populasi mencit dalam kandang pemeliharaan telah diusahakan dalam kondisi perawatan yang sama, misalnya : pakan, situasi kandang, jenis dan species yang digunakan, umur mencit tetapi masih terdapat perbedaan berat badan (Hume, 1972)

Randomisasi pengambilan sampel dilakukan dengan cara populasi mencit jantan galur BALB/ c umur 50 ± 10 hari sejumlah 100 ekor diberi nomor 1 sampai 100 kemudian dipilih 7 untuk kelompok kontrol dan 7 untuk masing-masing kelompok perlakuan dengan menggunakan tabel random. Misal untuk kelompok perlakuan I digunakan tabel random : 2015, 3128, 4235, 5678, 2437, 4357, 4965, berarti sampel mencit yang digunakan untuk kelompok perlakuan I adalah mencit dengan nomor 15, 28, 35, 78, 37, 57 dan 65, demikian seterusnya dan bila ada nomor yang sama maka akan diulang (Snedecor et al. 1967)

4.5. Variabel penelitian

4.5.1. Klasifikasi variabel

4.5.1.1. Variabel tergantung :

Adalah spermatogenesis yang diamati secara langsung yaitu menghitung jumlah spermatosit primer, spermatid, tebal epitel tubuli seminiferi dan diameter tubuli seminiferi, juga diamati secara tidak langsung dengan mengukur berat testis yang semuanya menggunakan skala rasio.

4.5.1.2. Variabel bebas :

Dosis pemberian per-oral, sebagai kontrol diberikan 0,1 ml garam fisiologis (pelarut) dan untuk perlakuan-1,2 dan 3 diberikan per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L: 2 mg, 4 mg, 8 mg/ 0,1 ml

4.5.1.3. Variabel kendali :

Jenis sediaan ekstrak *Phyllanthus niruri* L , species mencit, jenis kelamin mencit adalah jantan, umur mencit, makanan, minuman, kandang, perawatan selama penelitian dan cara mengukur berat testis cara membuat sediaan histologis, cara mengukur diameter dan tebal epitel tubuli seminiferi dan cara menghitung spermatosit primer dan spermatid

4.5.1.4. Variabel moderator :

Berat badan mencit sebelum dan sesudah penelitian dengan menggunakan skala rasio

4.6. Definisi operasional variabel

4.6.1. Variabel tergantung :

Mengukur berat testis yaitu berat testis kiri dan kanan masing-masing mencit dengan menggunakan timbangan digital merk Sartorius yang mempunyai kepekaan 4 angka dibelakang koma.

Menghitung jumlah spermatosit primer dan spermatid yang dikoreksi dengan Abercrombie's formula dan Sertoli correcting factor.

Mengukur tebal epitel tubuli seminiferi dengan cara Lothar W. et al. yaitu mengukur jarak antara membran basalis sampai ke permukaan lumen tubulus seminiferus

Mengukur diameter tubuli seminiferi dengan cara Lothar W et al., yaitu mengukur jarak antara dua titik yang berseberangan pada garis tengahnya, dimana titik-titik tersebut berada pada membrana basalis tubulus seminiferus

4.6.2. Variabel bebas :

Dosis pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Pada kelompok kontrol (K) diberikan per-oral 0,1 ml/ hari garam fisiologis (pelarut dari ekstrak *Phyllanthus niruri* L) selama 54 hari

Pada kelompok perlakuan-1 (P-1) diberikan per-oral 2 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* L /0,1 ml garam fisiologis /hari selama 54 hari

Pada kelompok perlakuan-2 (P-2) diberikan per-oral 4 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* L 0,1 ml garam fisiologis /hari selama 54 hari

Pada kelompok perlakuan-3 (P-3) diberikan per-oral 8 mg ekstrak *Phyllanthus niruri* L 0,1 ml garam fisiologis /hari selama 54 hari

4.6.3. Variabel kendali :

Jenis sediaan ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 2 mg/ 0,1 ml, 4 mg/ 0,1 ml, 8 mg/ 0,1 ml dan hanya 0,1 ml pelarutnya saja (garam fisiologis) didapat dari laboratorium Tradimun Gresik.

Species mencit : mencit galur Balb/ c umur 50 ± 10 hari dihitung sejak lahir sampai diberikan perlakuan ini dengan alasan secara seksual mencit jantan telah dewasa dan perubahan berat badan relatif stabil.

Jenis kelamin mencit adalah jantan.

Makanan, minuman, kandang dan pemeliharaan diusahakan dalam kondisi perawatan yang sama.

Cara pengamatan histologis:

Diamati dengan mikroskop binokuler merk canon Alphaphot Ys yang dilengkapi dengan okuler mikrometer.

4.6.4. Variabel moderator :

Berat badan mencit, dilakukan penimbangan sebelum dimulai penelitian dengan timbangan emas (gram) dan pada saat akhir penelitian dengan timbangan digital elektrik merk Sartorius yang mempunyai kepekaan 4 angka dibelakang koma.

4.7. Materi penelitian

Bahan uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak *Phyllanthus niruri* L yang diperoleh dari laboratorium Tradimun Gresik, dengan dosis 2, 4, 8 mg / 0,1 ml /per hari dan telah diuji di laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.(Maat , 1997). Belum ada ketentuan baku mengenai dosis pemakaian tanaman obat untuk pemakaian imunomodulator, menurut Wagner bahan/zat imunomodulator tidak mengikuti ketentuan aktivitas

dosis yang biasanya. Dari hasil penelitian Ma'at, 1997 dosis 2 mg/ 0,1 ml memberikan efek stimulasi yang maksimal.

Hewan coba : Digunakan mencit jantan (*Mus musculus*) galur BALB/ C diperoleh dari Pusat veterania farma Surabaya, Direktorat jenderal peternakan departemen pertanian R.I. jalan A. Yani 68-70 Surabaya.

Kandang hewan percobaan, mencit ditempatkan dalam tempat/ bak yang terbuat dari plastik dengan ukuran 30 X 50 X 15 cm, yang ditutup dengan kawat, beralaskan sekam. Sebelum digunakan, tempat/ bak didisinfektan dengan cara disemprot dengan larutan alkohol 70 %, sedangkan sekam dioven pada suhu 160 derajat celcius selama 2 jam dan disimpan dalam tempat yang rapat sebelum digunakan, kandang dibersihkan setiap 3 hari sekali dan sekam diganti dengan yang baru.

Makanan hewan percobaan, selama pengujian diberikan makanan Par G Pellet produksi PT. Japfa Comfeed Sidoarjo dengan nomor registrasi 187158 pada pagi dan sore hari, pada siang hari diberikan kecambah sebagai makanan tambahan sesuai anjuran dari Pus.Vet.Ma. Minuman hewan percobaan, diberikan minuman kemasan dalam galon "air K " produksi Koperasi Karyawan keluarga besar Petrokimia Gresik.

Bahan dan alat-alat yang digunakan :

1. Ekstrak *Phyllanthus niruri* L dengan dosis 2, 4 dan 8 mg/ 0,1 ml
2. Garam fisiologis (larutan NaCl 0,9 %) merk dagang Otsuka
3. Alkohol 70 %
4. Larutan alkohol untuk proses dehidrasi serta xylene untuk clearing
5. Ether untuk pembiusan

6. Aquadest
7. Larutan Bouin's
8. Parafin
9. Hematoxyllin untuk pengecatan
10. Canada balsam untuk mounting
11. Pakan mencit yaitu pelet yang dijual dipasaran yaitu Par G Pellet sebanyak 8 kilogram produksi PT. Japfa Comfeed Sidoarjo dengan nomor registrasi 187158 pada pagi dan sore hari, pada siang hari diberikan kecambah sebagai makanan tambahan dan minum mencit "air K" secukupnya.
12. Kandang mencit dari plastik dan ditutup kawat sebanyak 4 buah, diisi 7 ekor/ tempat
13. Gunting
14. Pinset chirurgis dan anatomis
15. Spuit 1 cc sebanyak 100 buah
16. Jarum no. 18 G khusus ujung bulat terbuat dari logam tumpul sebanyak 4 buah
17. Timbangan digital elektronik merk Sartorius, dengan kepekaan 4 angka dibelakang desimal
18. Stoples kecil dengan penutupnya untuk pembiusan
19. Botol-botol kecil dengan penutupnya untuk tempat fixasi jaringan
20. Cetakan dari logam berbentuk L untuk menuang parafin panas
21. Alat Autotechnicon automatic
22. Alat mikrotom putar
23. Water bath

24. Gelas obyek dan gelas penutupnya
25. Staining jar (tabung-tabung pengecatan)
26. Mikroskop dengan okuler yang mempunyai skala mikrometer
27. Alat counter
28. Alat pemotong kaca untuk identifikasi pada gelas obyek

4.8. Prosedur penelitian dan tehnik analisis data

Penelitian ini dilaksanakan menurut tahapan sebagai berikut :

a. Tahap persiapan :

Persiapan hewan coba, mencit terpilih ditempatkan dalam tempat/ bak plastik yang beralaskan sekam masing-masing 7 ekor untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3. Sebelum digunakan untuk pengujian, mencit tersebut harus diadaptasikan untuk hidup bersama dalam satu tempat/ baknya masing-masing selama satu minggu. Kalau dijumpai salah satu tikus yang agresif, segera diganti dengan yang baru yang diambil secara random, sampai diperoleh sample mencit yang hidup rukun dalam satu tempat/ bak. Hewan percobaan diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu sebelum dilakukan penelitian ini

b. Tahap perlakuan :

Sebelum diberikan perlakuan, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan satu per-sat ditimbang badannya untuk mendapatkan berat badan awal.

Cara memberikan larutan garam fisiologis maupun ekstrak *Phyllanthus niruri* L dilakukan setiap hari pada sore hari, mula-mula mencit diletakkan diatas kawat ram, kemudian ditarik ekornya dengan tangan kanan dan ibu jari dan telunjuk tangan kiri memegang kulit tengkuknya sedangkan jari manis dan

kelingking menjepit ekornya agar terfixasi selanjutnya mencit dibuat tengadah/terlentang.

Ekstrak *Phyllanthus niruri* L sebelum dihisap kedalam spuit dikocok dulu sehingga homogen, disediakan dosis 2 mg, 4 mg, 8 mg / 0,1 ml/ hari dan sebagai kontrol hanya diberikan 0,1 ml/ hari garam fisiologis (pelarutnya), diberikan per-oral dengan cara dimasukkan langsung kedalam pharynx mencit dengan memakai jarum khusus yang ujungnya bundar sehingga mirip sonde. Selanjutnya tangan kanan memegang spuit yang dilengkapi jarum khusus dengan ujung bulat dan telah diisi dengan dosis yang telah ditentukan, dimasukkan melalui mulut (per-oral) larutan yang telah ditentukan melalui pharynx, oesophagus sampai dilambungny. Bila ditengah perjalanan dirasa ada hambatan, maka jarum ditarik dengan halus dan dicoba lagi, dengan sedikit pengalaman maka peneliti bisa merasakan bahwa ujung jarum sudah berada dilambung. Cara seperti ini ditempuh untuk menghindarkan tumpah atau meleleh-keluarnya kembali larutan yang diberikan, sehingga bisa dijamin keakuratan jumlah dan dosis dari larutan tersebut.jarum dimasukkan kedalam pharynx sampai ke lambung dan dikeluarkan isinya, dengan demikian tidak ada obat yang tertumpah keluar sehingga keakuratan dosis bisa terjamin.

Setelah dipakai ekstrak obat ini ditutup rapat dan disimpan pada suhu kamar untuk mencegah penguapan dan tidak stabilnya dosis

Masing-masing kelompok sebanyak 7 ekor mencit jantan, semuanya ada 4 kelompok .

Kelompok kontrol (K) diberikan garam fisiologis (pelarut) per-oral 0,1 ml selama 54 hari.

Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok masing-masing terdiri dari 7 ekor mencit jantan diberi nama kelompok P-1,2 & 3

Kelompok P-1 : 7 ekor mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara peroral selama 54 hari dengan dosis 2 mg/0,1 ml. garam fisiologis

Kelompok P-2 : 7 ekor mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara peroral selama 54 hari dengan dosis 4 mg/0,1 ml. garam fisiologis

Kelompok P-3 : 7 ekor mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri* L secara peroral selama 54 hari dengan dosis 8 mg/0,1 ml. garam fisiologis

c. Tahap pengumpulan data, meliputi :

1. Penimbangan berat badan awal dan akhir.
2. Pengukuran berat testis kanan dan kiri (dalam gram)
3. Pengukuran diameter tubulus seminiferus (dalam mikron)
4. Pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus (dalam mikron)
5. penghitungan jumlah sel spermatosit primer
6. Penghitungan jumlah sel spermatid

Cara menimbang berat testis mencit :

Pada hari ke 55 semua mencit dikorbankan dengan menggunakan ether, kemudian ditimbang berat badannya untuk mendapatkan berat badan akhir. Setelah dibuat sayatan pada dinding perut, testis diambil dengan pinset dan gunting chirurgis dibersihkan dari jaringan sekitar. kemudian masing-masing testis kiri dan testis kanan ditimbang beratnya dengan timbangan merk Sartorius yang mempunyai kepekaan 4 desimal dibelakang koma. Sampel penelitian adalah berat testis kiri dan kanan masing- masing kelompok mulai dari kelompok kontrol, kelompok perlakuan-1, perlakuan-2 dan perlakuan-3.

Selanjutnya testis dimasukkan kedalam botol kecil-kecil yang sudah berisi larutan Bouin's sebagai fiksasi dan sudah tertera identifikasinya untuk masing-masing testis kiri dan kanan serta asal kelompoknya untuk dipersiapkan dibuat preparat histologi.

Prosedur kerja Histologi :

Untuk pembuatan preparat histologi, dipersiapkan testis yang sudah dibersihkan dari jaringan sekitar masing-masing dari kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3, kemudian dimasukkan kedalam larutan Bouin's sebagai fiksasinya sekaligus bahan untuk transportasi agar testis tidak rusak.

Cara pembuatan sediaan histologi dilakukan beberapa tahap :

Fiksasi

Dilakukan dengan menggunakan larutan Bouin's, testis direndam selama 24 jam

Pencucian

Merendam jaringan testis sebanyak tiga kali kedalam larutan alkohol 70 %

Dehidrasi

Merendam jaringan testis kedalam alkohol berturut-turut dimulai dengan alkohol 70% selama satu jam, selanjutnya alkohol 80% selama dua jam, alkohol 90% selama dua jam dan akhirnya alkohol 100% selama satu jam sampai 18 jam.

Clearing

Memasukkan jaringan testis kedalam campuran alkohol dan xylol dengan perbandingan 1 : 1, secara berturut-turut tiga kali masing-masing satu jam, kemudian jaringan testis direndam dalam xylol selama setengah jam.

Infiltrasi

Mula-mula jaringan testis dimasukkan kedalam campuran parafin dan xylol dengan perbandingan 1 : 1 selama setengah jam didalam lemari pemanas dengan temperatur 65%. Kemudian jaringan testis dimasukkan kedalam parafin murni (dalam bentuk cairan) tiga kali masing-masing selama 45 menit.

Embedding

Mencetakkan jaringan testis dengan parafin cair dan panas dituangkan kedalam cetakan berbentuk kubus. Kemudian jaringan testis dimasukkan kedalamnya dengan posisi yang diatur sedemikian rupa, dianginkan hingga parafin menjadi beku.

Trimming

Memotong bagian sudut-sudut yang runcing pada cetakan parafin yang sudah beku, untuk mempermudah proses pemotongan dengan mikrotom.

Pemotongan

Memotong cetakan parafin dengan mikrotom, dengan tebal sayatan sekitar 5 mikron. Cetakan parafin yang sudah beku dan berisi jaringan testis ditempelkan pada alat pemegang yang terdapat pada mikrotom untuk proses pemotongan selanjutnya. Pisau mikrotom diatur dengan membuat sudut sekitar 60 ° terhadap sayatan tersebut.

Affixing

Meletakkan lembaran sayatan hasil pemotongan pada sediaan dengan menggunakan perekat albumin dari Meyer. Sayatan diletakkan diatas kaca sediaan yang telah dibersihkan dari lemak dan telah ditetesi dengan perekat albumin dari Meyer. Kemudian sediaan diletakkan diatas lempeng besi panas (slide warmer)

selama 24 jam, supaya parafin mengembang dan jaringan dapat diatur agar sempurna letaknya

Rehidrasi

Mula-mula dimasukkan kedalam larutan xylol dua kali agar sisa parafin dapat larut. Kemudian dimasukkan kedalam alkohol secara berurutan dari alkohol 100 % dua kali, 90 % dan 70 % masing-masing selama 3 menit, terakhir dimasukkan kedalam air sampai jaringan berwarna putih.

Pewarnaan

Sediaan dimasukkan kedalam larutan Erlich's acid haematoxylline selama 4 menit, kemudian dicuci dengan air. Sisa-sisa zat warna yang mengotori kaca sediaan dibersihkan dengan kertas pembersih. Yang perlu diperhatikan apakah warna sediaan sudah cukup baik dan kontras terhadap jaringan testis tersebut.

Dehidrasi

Merendam kembali sediaan secara berurutan selama satu menit masing-masing kedalam larutan alkohol 90 %, 100 % dua kali, kemudian direndam dalam larutan xylol dua kali sambil dibersihkan.

Mounting

Merupakan suatu proses yang digunakan untuk melekatkan kaca penutup jaringan testis diatas kaca sediaan. Mula-mula perekat balsam Canada ditetaskan secukupnya diatas jaringan testis yang terletak diatas kaca sediaan. Kemudian dengan posisi miring dan hati-hati kaca penutup jaringan ditempelkan diatasnya dan yang perlu diperhatikan ialah agar tidak ada gelembung udara yang masuk disela-sela antara dua kaca tersebut. Sisa-sisa perekat yang berasal dari sediaan dibersihkan selama 24-48 jam.

Labelling

Masing-masing sediaan diberi label sesuai dengan nomor urut sampel dan asal kelompok agar mudah diidentifikasi. Selanjutnya pemotretan dan pengukuran terhadap hasil sediaan histologis. Pemotretan dilakukan secara foto mikrografi dan pengukuran diameter dengan menggunakan okuler mikrometer yang sudah dikalibrasi.

Cara pengukuran diameter, tebal epitel tubulus seminiferus, menghitung jumlah spermatosit primer dan spermatid.

Testis yang akan dibuat sediaan histologis, difiksasi dengan larutan Bouin's selama 24 jam, kemudian diproses dengan alat Autotechnicon yang dijalankan secara otomatis selama sehari semalam (24jam) . Dari satu testis diambil 1 potongan melintang tepat tegak lurus sumbu panjangnya dengan ketebalan kurang lebih 0,3 sentimeter. Setelah diproses dan diblok dengan parafin, sediaan dipotong dengan mikrotom putar dengan ketebalan 5 mikron. Dari satu blok sediaan testis kanan dan kiri masing-masing diambil 6 irisan dengan jarak antara satu irisan dengan irisan yang lain kurang lebih 15 irisan, sehingga satu ekor mencit mempunyai 12 irisan. Irisan-irisan tersebut ditempelkan pada objek-objek gelas yang sudah diberi tanda/ identifikasi. Kemudian sediaan dicat dengan pengecatan Hematoxylin (Russel et al.,1990).

Cara pengumpulan data : dari testis yang berasal dari seekor mencit, dicari diantara 12 irisan testis yang telah dibuat tersebut, sebanyak 25 potongan melintang tubuli seminiferi. Dicari sedapat mungkin yang benar-benar terpotong tegak lurus dengan sumbu panjangnya, yaitu yang penampang melintangnya tampak benar-benar bundar. Dipilih stage VII (langkah VII) siklus epitel karena

mudah dikenali dan permukaan lumennya relatif rata sehingga memudahkan pengukuran tebal epitelnya dan diameter tubuli seminiferi. Disamping juga tetap dapat mudah dikenalnya sel pakiten spermatosit primer dan spermatid bulat. Dengan memilih salah satu stage saja sebagai unsur pembanding antar kelompok hewan percobaan, diharapkan akan didapat angka-angka yang reliabel. 25 potongan tersebut diambil secara at random. Yaitu Sediaan digerakkan sepanjang sumbu X dan Y dengan jarak 8 mikron setiap perpindahan, secara uniform random sampling, pengukuran tebal epitel tubulus seminiferi dan diameter tubuli seminiferi dengan menggunakan okuler mikrometer, menghitung jumlah spermatosit primer dan spermatid menggunakan mikroskop dengan pembesaran obyektif 40 X dan dilakukan dengan pertolongan alat counter.

Cara pengukuran diameter tubulus adalah seperti dilakukan oleh Lothar W et al. (1976), yaitu dengan mengukur jarak terdekat antara dua titik yang berseberangan pada garis tengahnya, dimana titik-titik tersebut berada pada batas antara membrana basalis dan sel epitel germinal. Pengukuran tebal epitel juga mulai dari titik itu sampai kepermukaan lumen.

Disamping itu diukur juga rata-rata diameter inti dari sel pakiten spermatosit primer dan spermatid bulat. Cara pengukuran adalah diambil secara random sebanyak empat puluh sel pakiten spermatosit primer dan empat puluh sel spermatid bulat, diukur diameter intinya, kemudian baru dirata-rata. Diameter - diameter inti ini digunakan untuk mengkoreksi angka perhitungan mentah (crude count) dari jumlah sel pakiten spermatosit primer dan spermatid , yaitu dengan Abercrombie's formula (Simorangkir, 1985)

$$T = C \times \frac{S}{S + d}$$

T = true count

C = Crude count

S = Tebal sayatan sediaan = 5 mikron

d = Diameter inti

Koreksi ini perlu dilakukan karena jumlah sel terhitung (crude count) akan selalu berbeda dengan jumlah sel sesungguhnya (true count), tergantung dari tebal sayatan dan besarnya diameter inti yang dihitung.

Hasil ini masih dikoreksi lagi dengan Sertoli correcting factor, sehingga didapatkan correcting factor. koreksi ini dilakukan mengingat hasil suatu perlakuan dapat menyebabkan terjadinya pengecilan atau mengkerutnya tubulus seminiferus. Pemendekan pada arah sumbu memanjang dapat menyebabkan kesalahan angka hasil perhitungan karena pada ketebalan sayatan yang sama, makin memendeknya tubulus, maka akan makin banyak inti yang ikut serta terhitung.

Dari satu kelompok mencit yang terdiri dari 7 ekor akan didapatkan 175 potongan melintang tubulus seminiferus, karena masing-masing mencit dengan 25 potongan melintang., maka satu ekor mencit akan didapatkan 25 angka diameter tubulus, 25 angka tebal epitel tubulus, 25 angka pachiten yang sudah terkoreksi dan 25 angka round spermatid yang juga sudah terkoreksi. Kemudian dari ke 25 angka-angka tersebut masing-masing dicari angka rata-ratanya (mean).

$$\text{Sertoli correcting factor} = \frac{\text{Jumlah inti sel Sertoli (N)}}{\text{Jumlah inti sel Sertoli (F)}}$$

Keterangan : N = kelompok kontrol

P = kelompok perlakuan

Untuk keempat kelompok mencit didapatkan 4 angka rata-rata. Dengan memakai uji statistik analisa varian satu arah, maka akan diketahui adanya perbedaan antara kelompok-kelompok diatas.

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dimaksudkan untuk mengetahui adakah pengaruh diameter tubulus seminiferus akibat dari suatu perlakuan. Pengukuran tebal epitel akan memberikan gambaran yang lebih jelas, sebab mungkin saja telah terjadi penipisan tebal epitel, akan tetapi diameter tubulusnya masih seperti semula, yang mana berarti lumennya saja yang lebih besar.

Penghitungan jumlah pakiten spermatosit primer dan spermatid bulat dimaksudkan, untuk mendeteksi ada atau tidaknya perubahan proses spermatogenesis akibat perlakuan.

Seperti diuraikan diatas, bahwa dengan adanya pembelahan reduksi (meiosis) maka dari satu pakiten spermatosit kelak akan terbentuk empat round spermatid. Jadi bila dari perhitungan ternyata hasilnya didapatkan perbandingan antara jumlah pakiten dan spermatid bulat lebih kecil dari 1 dibanding 4, maka dapatlah dikatakan bahwa perlakuan tersebut mengganggu proses meiosis.

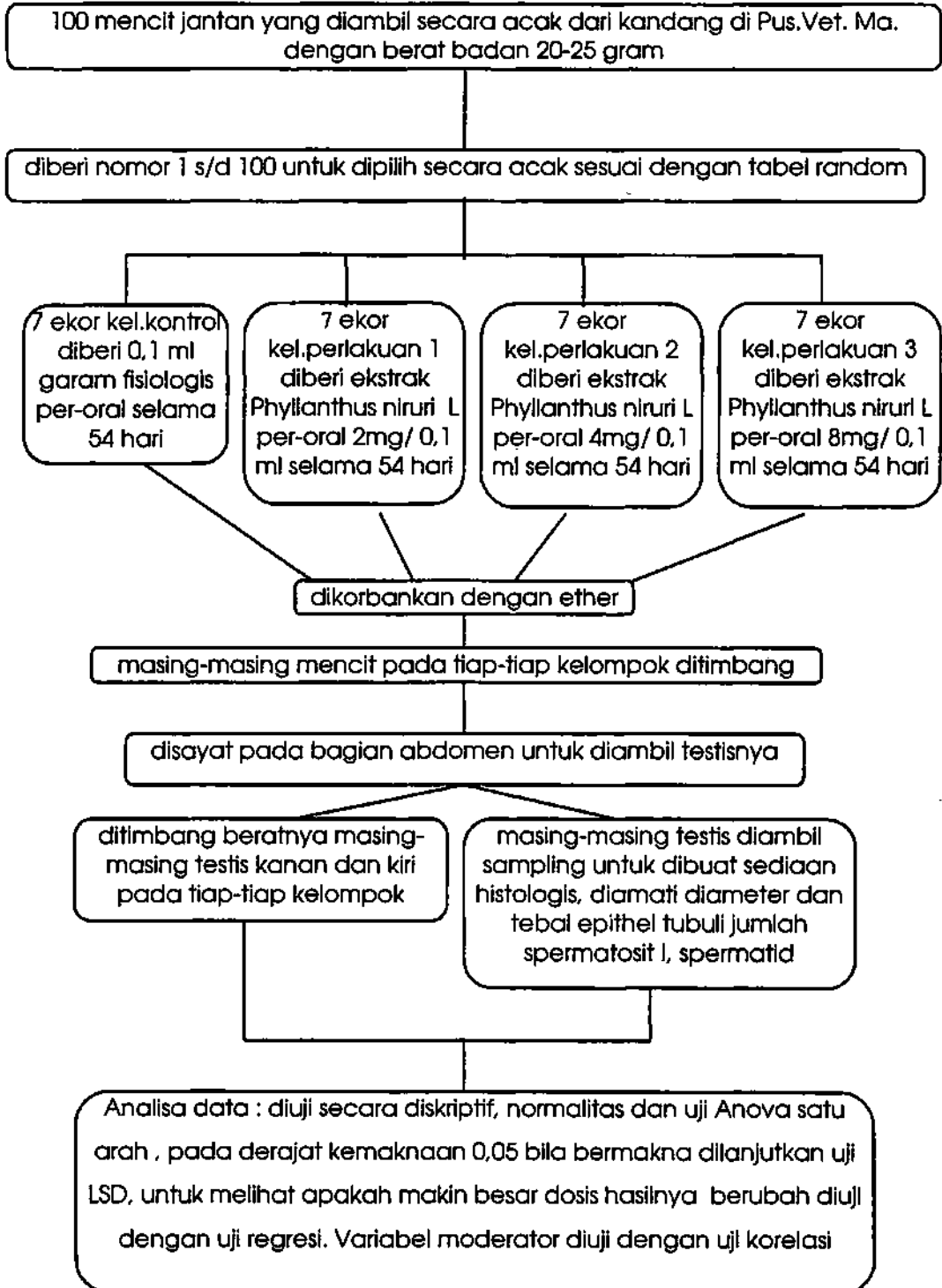
Apabila jumlah sel pakiten spermatosit dan sel spermatid bulat tetap normal, padahal ada pengurangan tebal epitel, maka dapatlah disimpulkan bahwa perubahan terjadi pada tahap pendewasaan spermatid (Simorangkir, 1985)

d. Tahap analisis data

Hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel dan diagram/ grafik, sedangkan untuk menganalisa hasil-hasil pengujian masing variabel pada kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 diuji secara diskriptif, normalitas dan uji Anova satu arah untuk menentukan beda antar kelompok, pada derajat kemaknaan 0,05

bila Anova satu arah bermakna dilanjutkan dengan uji LSD (BNT= beda nyata terkecil) untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda. Untuk melihat apakah makin besar dosis hasilnya akan berubah maka diuji dengan uji regresi. Variabel moderator diuji dengan uji korelasi

Bagan perlakuan terhadap mencit jantan (*Mus musculus*)



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil penelitian

Untuk menguji hipotesis bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* L. dapat meningkatkan fungsi testis dalam proses spermatogenesis mencit jantan, telah dilakukan serangkaian penelitian proses spermatogenesis mencit yang diwakili oleh pengamatan terhadap :

- (a) Berat testis mencit
- (b) Diameter tubulus seminiferus
- (c) Tebal epitel tubulus seminiferus
- (d) Jumlah spermatosit primer
- (e) Jumlah spermatid

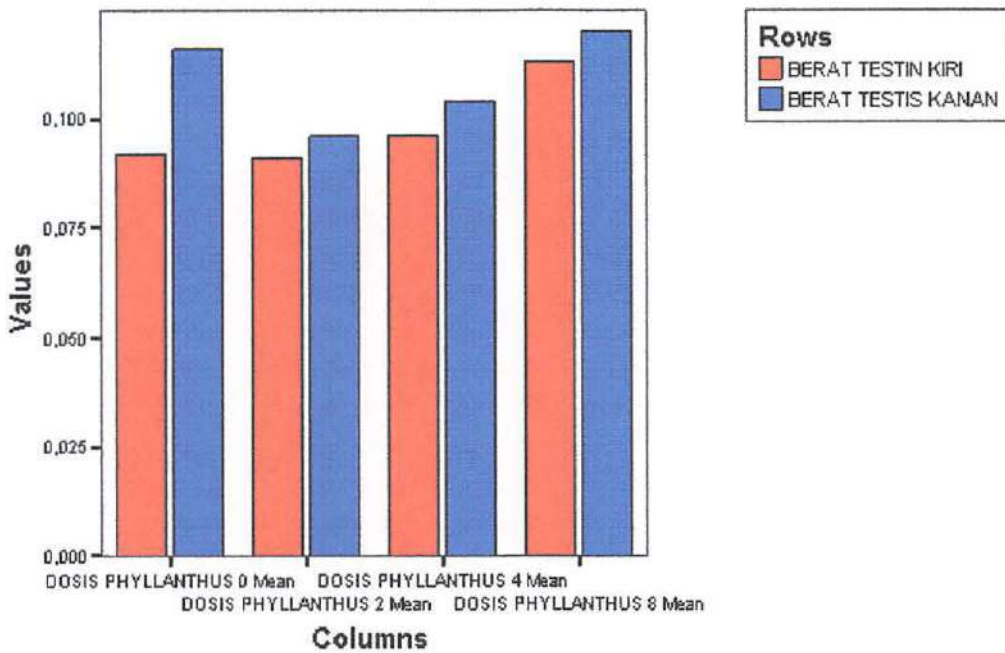
Rata-rata data hasil pengamatan yang meliputi penimbangan dan pengukuran terdapat pada lampiran 1 sampai dengan 22, data pendukung dan rangkuman rata-rata data pada lampiran 11.

5.1.1. Berat testis mencit kiri dan kanan

Data lengkap hasil penimbangan berat testis kiri dan kanan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan te. dapat pada lampiran 2, dan rangkuman rata-rata data berat testis kiri dan kanan terdapat pada lampiran 11. Rata-rata data hasil penimbangan testis mencit kiri dan kanan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Rata-rata data hasil penimbangan berat testis mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (gram)

Penimbangan Berat testis	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg / 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Kiri	0,0924 ± 0,007	0,0912 ± 0,013	0,0962 ± 0,011	0,1136 ± 0,017
kanan	0,1161 ± 0,032	0,0960 ± 0,010	0,1042 ± 0,009	0,1202 ± 0,019

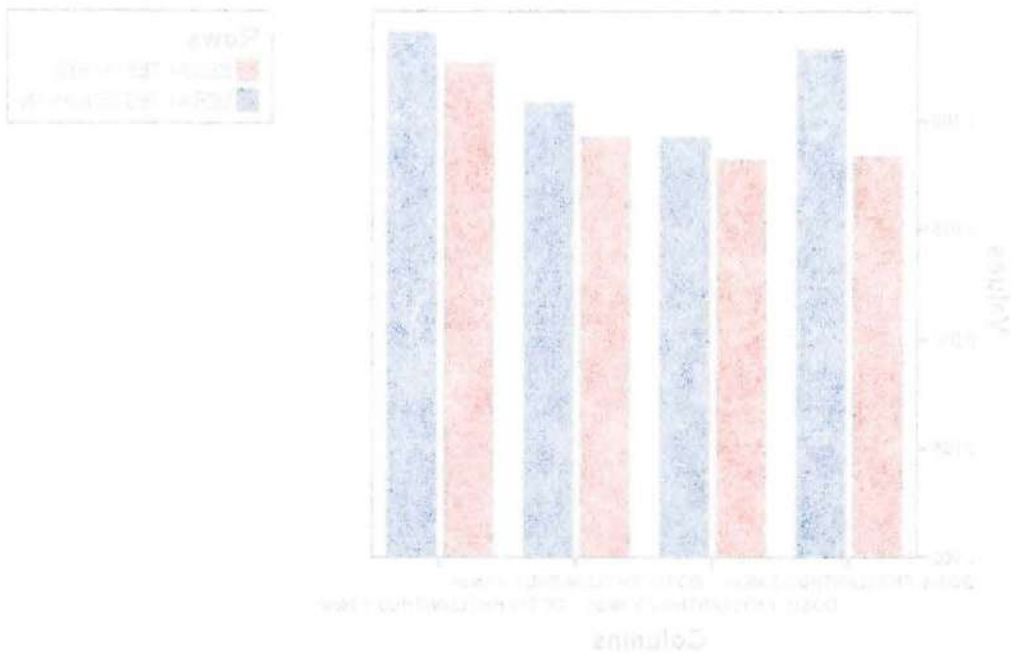


Gambar 5.1.1 Diagram batang rata-rata berat testis kanan dan kiri pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Rata-rata berat testis kiri mencit mengalami peningkatan setelah dosis 4 mg/0,1 ml dan berat testis kanan mengalami peningkatan pada dosis 8 mg/ 0,1 ml pada pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Tabel 24.1. Diagram batang tiga-tara hasil penimbangan berat leafy material sebelum dan sesudah kontrol dan kontrol plus dengan ekstrak Phyllanthus niruri (L.)

Penimbangan	Kontrol Plus			Kontrol		
	0 mg/0,1 ml	2 mg/0,1 ml	4 mg/0,1 ml	0 mg/0,1 ml	2 mg/0,1 ml	4 mg/0,1 ml
Awal	0,1736 ± 0,017	0,2003 ± 0,017	0,0842 ± 0,013	0,0828 ± 0,007	0,0850 ± 0,010	0,1787 ± 0,032
Akhir	0,1503 ± 0,032	0,1603 ± 0,005	0,1010 ± 0,010	0,1503 ± 0,032	0,1503 ± 0,032	0,1503 ± 0,032



Gambar 24.1. Diagram batang tiga-tara hasil penimbangan berat leafy material sebelum dan sesudah kontrol dan kontrol plus dengan ekstrak Phyllanthus niruri (L.)

Hasil penimbangan berat leafy material sebelum dan sesudah kontrol dan kontrol plus dengan ekstrak Phyllanthus niruri (L.) dapat dilihat pada Gambar 24.1. Diagram batang tiga-tara menunjukkan bahwa berat leafy material sebelum dan sesudah kontrol dan kontrol plus dengan ekstrak Phyllanthus niruri (L.) tidak berbeda secara signifikan.

5.1.2 Diameter tubulus seminiferus

Data lengkap hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus testis mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat pada lampiran 3, rangkuman rata-rata data diameter tubulus seminiferus pada lampiran 11, sedangkan rata-rata data hasil pengukuran diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Rata-rata data diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (mikron)

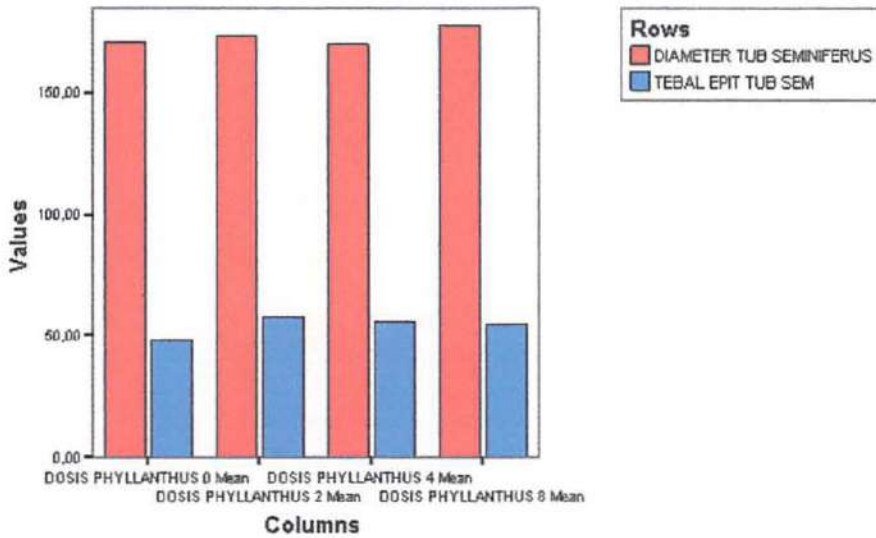
Pengamatan :	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/ 0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg/ 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Diameter t.s.	170,77 ± 0,15	173,64 ± 0,13	170,14 ± 0,45	178,01 ± 0,15

5.1.3 Tebal epitel tubulus seminiferus

Data lengkap hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus testis mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat pada lampiran 4, rangkuman rata-rata data diameter tubulus seminiferus pada lampiran 11, sedangkan rata-rata data hasil pengukuran tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.3

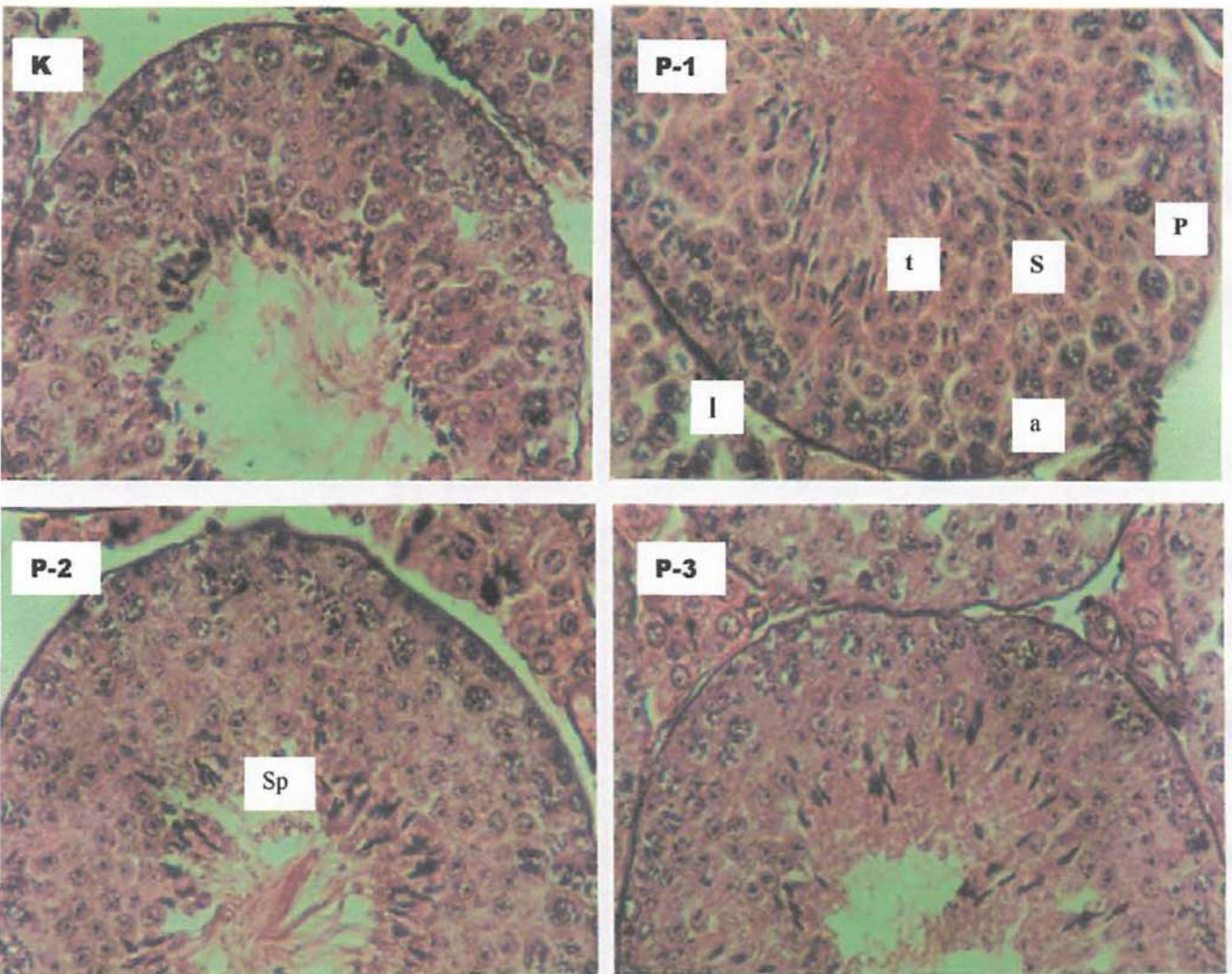
Tabel 5.3 Rata-rata data tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (mikron)

Pengamatan :	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/ 0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg/ 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Tebal epitel t.s.	48,20 ± 0,14	57,59 ± 0,09	55,71 ± 0,20	54,47 ± 0,13



Gambar 5.1.3 : Diagram batang rata-rata diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus mencit pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L. (mikron)

Rata-rata diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus mengalami peningkatan dengan peningkatan dosis dibanding dengan kontrol, sudah jelas terlihat peningkatan pada dosis 2 mg/ 0,1 ml ekstrak *Phyllanthus niruri* L, tetapi tidak sesuai dengan besarnya dosis, artinya semakin besar dosis tidak sebanding dengan semakin besarnya ukuran diameter dan tebalnya tubulus seminiferus. Diameter tubulus seminiferus mulai meningkat pada dosis 2 mg/ 0,1 ml kemudian menurun lagi pada dosis 4 mg/0,1 ml dan 8 mg/0,1 ml . Tebal epitel tubulus seminiferus mulai meningkat pada dosis 2 mg/ 0,1 ml, kemudian agak menurun pada dosis 4 mg/ 0,1 ml dan meningkat lagi pada dosis 8 mg/ 0,1 ml pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada mencit. Struktur anatomi tubulus seminiferus dari mencit jantan dewasa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada gambar 5.1.3a

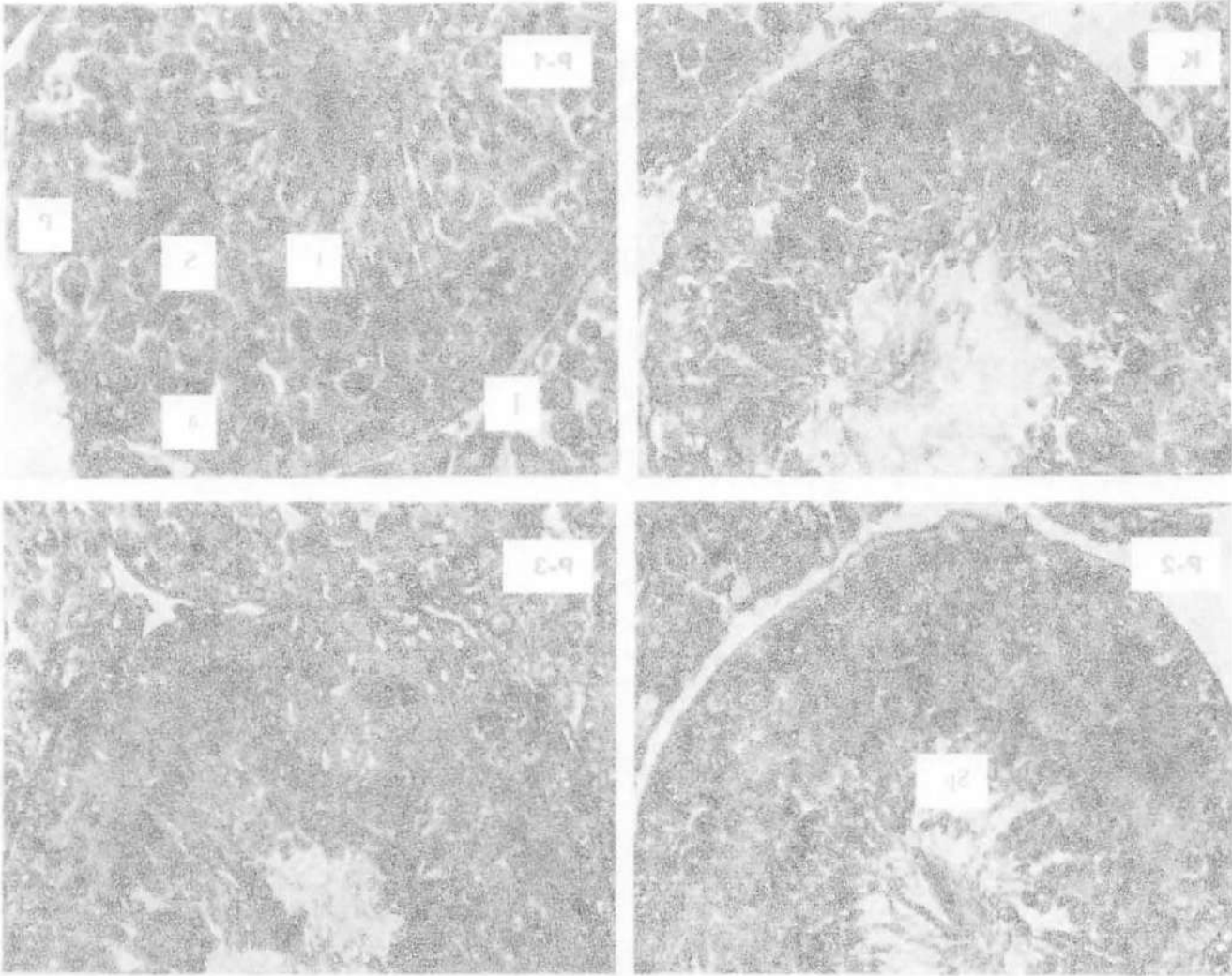


gambar 5.1.3a : Struktur Anatomi tubulus seminiferus dari mencit jantan dewasa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Pembesaran 10 x 40)

Keterangan :

Kel. Kontrol : 0,1 ml garam fisiologis
 Kel. P-1 : 2 mg/0,1 ml ekstrak *Phyllanthus niruri* L
 Kel. P-2 : 4 mg/0,1 ml ekstrak *Phyllanthus niruri* L
 Kel. P-3 : 8 mg/0,1 ml ekstrak *Phyllanthus niruri* L

S = Sel Sertoli, L = Sel Leydig, a = Sel Spermatogonium, P = Sel Spermatisit primer fase pakiten,
 t = Sel Spermatid, Sp = Sel Spermatozoa



Gambar 2.1.3a : Struktur Anatomi tubulus seminiferus dari menjadi jantan dewasa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Pembesaran 10 x 40)

Keterangan

Kel. Kontrol : 0,1 ml cairan fisiologis

Kel. P-1 : 2 mg 0,1 ml ekstrak Phyllanthus uteri

Kel. P-2 : 4 mg 0,1 ml ekstrak Phyllanthus uteri

Kel. P-3 : 8 mg 0,1 ml ekstrak Phyllanthus uteri

1 = Sel spermatid, 2p = Sel spermatosoa

2 = Sel ovarif, 1 = Sel korpus, 4 = Sel spermatogonium, P = Sel spermatosit primer fase pertama

5.1.4 Jumlah sel spermatosit primer terkoreksi

Angka-angka yang didapat disebut crude counts. Angka angka tersebut kemudian dikoreksi dengan Abercrombie's formula (Simorangkir, 1985)

$$T = C \times \frac{s}{s + d}$$

T = True count

C = Crude count

s = tebal sayatan, dalam hal ini = 5 mikron

d = diameter inti.

Setelah diketahui T (true count) masih harus dikalikan dengan Sertoli correcting factor

$$\text{Sertoli correcting factor} = \frac{\text{jumlah inti sel Sertoli kontrol}}{\text{jumlah inti sel Sertoli perlakuan}}$$

Data lengkap hasil penghitungan jumlah sel spermatosit primer kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat pada lampiran 5, , rangkuman rata-rata data penghitungan jumlah sel spermatosit primer terdapat pada lampiran 11 pengukuran inti sel spermatosit primer terdapat pada lampiran 7, penghitungan jumlah sel Sertoli terdapat pada lampiran 9 dan hasil akhir penghitungan jumlah sel spermatosit primer terkoreksi terdapat pada lampiran 10

Data hasil akhir jumlah sel spermatosit primer terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel : 5.4

Tabel 5.4 Rata-rata data jumlah spermatosit primer terkoreksi pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Pengamatan :	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/ 0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg/ 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Jumlah sel Spermatosit I	17 ± 0,14	25 ± 0,11	26 ± 0,14	19 ± 1,25

5.1.5 Jumlah sel spermatid terkoreksi

Sama dengan penghitungan sel Spermatisit primer, penghitungan sel spermatid juga memakai Abrecombie's Formula dan masih harus dikalikan dengan Sertoli correcting factor (Simorangkir, 1985)

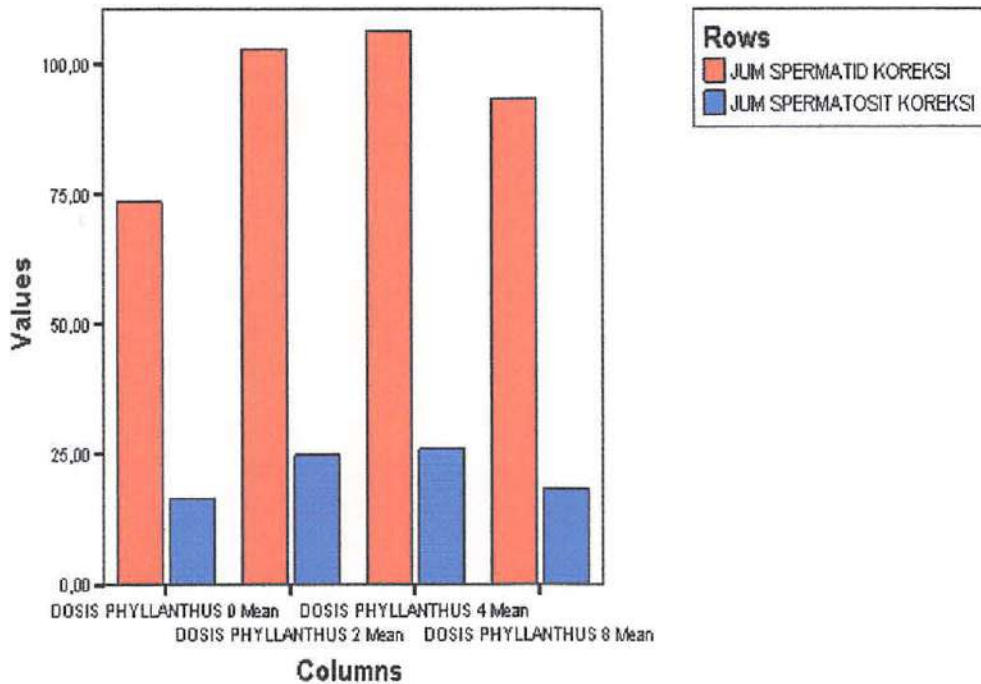
Data lengkap hasil penghitungan jumlah sel spermatid kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat pada lampiran 6, rangkuman rata-rata data penghitungan jumlah sel spermatid terdapat pada lampiran 11, pengukuran inti sel spermatid terdapat pada lampiran 8, penghitungan jumlah sel Sertoli terdapat pada lampiran 9 dan hasil akhir penghitungan jumlah sel spermatid terkoreksi terdapat pada lampiran 10

Data hasil akhir jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel : 5.5

Tabel 5. 5 Rata-rata data jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Pengamatan :	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/ 0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg/ 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Jumlah sel Spermatid	74 ± 0,33	99 ± 0,69	100 ± 0,38	88 ± 6,81

JUMLAH SPERMATID DAN SPERMATOSIT TERKOREKSI MENURUT DOSIS PHYLLANTHUS



Gambar : 5.1.5 Diagram batang rata-rata jumlah sel spermatozot primer dan sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan sesudah pemberian tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L

Perbandingan jumlah sel spermatozot primer dengan sel spermatid terkoreksi

$$\text{Kel.K} = 17 : 74 = 1 : 4,3529$$

$$\text{Kel. P-1} = 24 : 99 = 1 : 4,125$$

$$\text{Kel. P-2} = 25 : 100 = 1 : 4$$

$$\text{Kel. P-3} = 19 : 88 = 1 : 4,8888$$

Rata-rata jumlah sel spermatosit primer dan spermatid terkoreksi mengalami peningkatan walaupun tidak sesuai dengan meningkatnya dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L , baik sel spermatosit primer maupun sel spermatid peningkatan tertinggi terjadi pada dosis 4 mg/ 0,1 ml , kemudian menurun sedikit pada dosis 8 mg/ 0,1 ml.

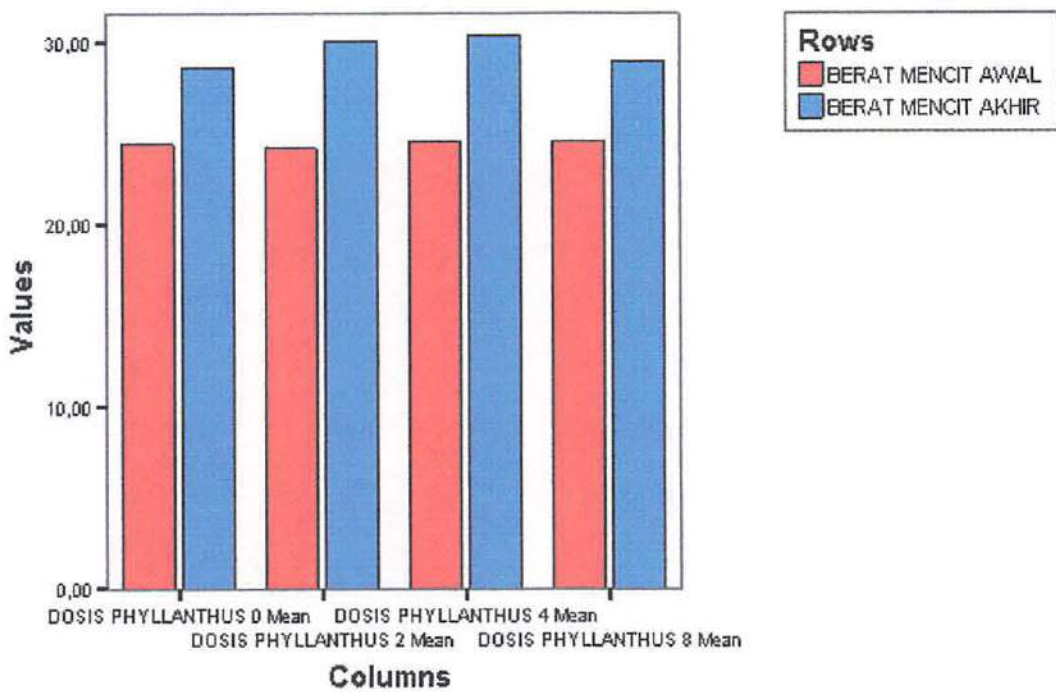
Pada perhitungan ternyata didapatkan bahwa perbandingan jumlah sel spermatosit primer dengan spermatid tidak lebih kecil dari 1 : 4, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* L tidak mengganggu proses meiosis, bahkan merangsang, hal ini juga terlihat pada sediaan histologis bahwa semua sel gamet sedang dalam keadaan meiosis.

5.1.6 Berat badan mencit

Berat badan mencit adalah variabel moderator, mencit ditimbang bergantian pada waktu awal dan akhir (setelah selesai perlakuan). Data lengkap hasil penimbangan berat badan mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan terdapat pada lampiran 1. rangkuman rata-rata data hasil penimbangan berat badan awal dan akhir terdapat pada lampiran 11, rata-rata data hasil penimbangan berat badan mencit kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.6

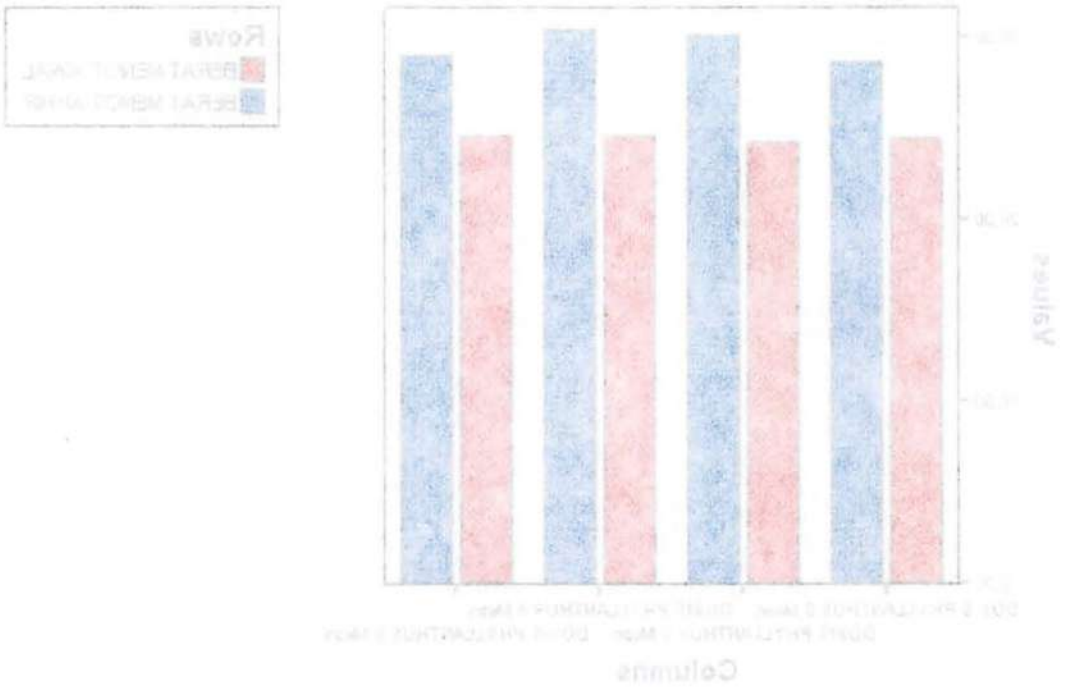
Tabel 5.6 Rata-rata data berat badan mencit awal dan akhir sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (gram)

Pengamatan :	Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> L			
	0 mg/ 0,1 ml	2 mg/ 0,1 ml	4 mg/ 0,1 ml	8 mg/ 0,1 ml
Berat badan				
Awal	24,43 ± 0,53	24,21 ± 0,49	24,64 ± 0,48	24,57 ± 0,45
Akhir	28,70 ± 2,16	30,14 ± 2,19	30,47 ± 3,63	29,30 ± 1,83



Gambar 5.1.6 Diagram batang rata-rata berat badan mencit awal dan akhir sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L (gram)

Berat mencit akhir penelitian terlihat mengalami peningkatan dibanding dengan pada awal penelitian. Berat mencit sebagai variabel moderator untuk diamati apakah merupakan variabel pengganggu (confounding variable)



Gambar 5.1.6 Diagram batang rata-rata berat badan mencit awal dan akhir sesudah perlakuan tiga macam dosis ekstrak Phyllanthus (www.f.guan)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Phyllanthus terhadap berat badan mencit. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuasi eksperimental dengan menggunakan variabel terikat sebagai variabel respon dan variabel bebas sebagai variabel perlakuan (confounding variable).

5.2. Analisis data penelitian

Semua data mulai dari data berat testis mencit, diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatosit primer, jumlah sel spermatid dan berat badan awal dan akhir mencit untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok, dilakukan analisis varian satu arah. Sebelum analisis, data diuji normalitasnya dengan Kolmogorov - Smirnov dan Shapiro-Wilk untuk menentukan apakah sampel berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas Kolmogorov - Smirnov disajikan pada lampiran 12. Pada kesimpulannya oleh karena p hitungan lebih besar dari α maka sampel tersebut berdistribusi normal, sehingga bisa dilanjutkan dengan analisis varian satu arah.

5.2.1 Berat testis mencit

Perhitungan dan hasil analisis varian satu arah berat testis kiri dan kanan terdapat pada lampiran 13, sedangkan rangkuman hasil analisis varian satu arah disajikan pada tabel 5.7

Tabel 5.7 Rangkuman analisis varian satu arah berat testis mencit

Sumber varian :	JK	dk	KT	F	P
Testis kiri					
Antar kelompok (BG)	0,0002	3	0,0007	5,051	0,007
Didalam kelompok (WG)	0,0003	24	0,0001		
Total	0,0005	27			
Testis kanan					
Antar kelompok (BG)	0,0002	3	0,0008	2,143	0,121
Didalam kelompok (WG)	0,0009	24	0,0003		
Total	0,0011	27			

Disimpulkan sebagai berikut :

Berat testis kiri $F = 5,051$ dan signifikansinya $0,007$, maka terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok.

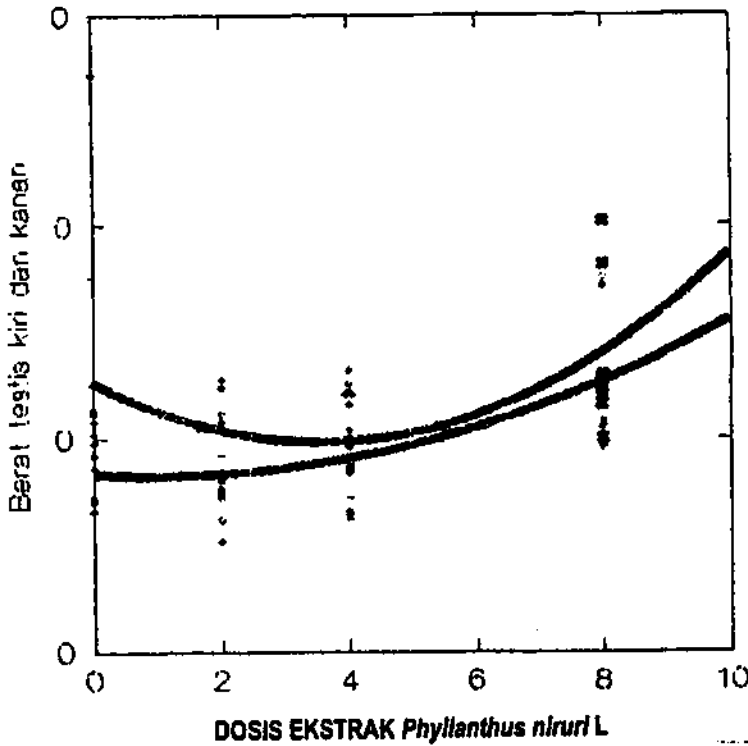
Berat testis kanan $F = 2,143$ dan signifikansinya $0,121$, maka terdapat perbedaan yang tidak bermakna antar kelompok

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji LSD (BNT = beda nyata terkecil). Hasil uji ini terdapat pada lampiran 14, sedangkan rangkuman hasil uji BNT disajikan pada tabel 5.8

Tabel 5.8 Rangkuman hasil uji BNT berat testis kiri dan kanan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

KESIMPULAN		
Pasangan kelompok penelitian	Testis kiri	Testis kanan
Kel.kontrol - Kel perlakuan-1	Tidak bermakna	Tidak bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-2	Tidak bermakna	Tidak bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-3	Bermakna	Tidak bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-2	Tidak bermakna	Tidak bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-3	Bermakna	Tidak bermakna
Kel perlakuan-2 - Kel perlakuan-3	Tidak bermakna	Tidak bermakna

Dari hasil uji BNT dapat diinformasikan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada testis kiri pada pasangan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan-3 dan pasangan kelompok perlakuan-1 dengan kelompok perlakuan-3, sedangkan pasangan kelompok yang lain baik testis kiri maupun testis kanan tidak bermakna, sehingga tidak dilanjutkan ke analisa regresi.



Gambar 5.2.1 Hubungan berat testis kiri dan kanan dengan dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L

5.2.2 Diameter tubulus seminiferus

Dari tabel 5.2. dapat diketahui bahwa diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol lebih kecil dari pada kelompok perlakuan .

Hasil analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus disajikan pada lampiran 15, rangkuman analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus disajikan pada tabel 5.9

Tabcl 5.9 Rangkuman analisis varian satu arah diameter tubulus seminiferus

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	275,613	3	91,871	1390,479	0,000
Didalam kelompok (WG)	1,586	24	0,0006		
Total	277,199	27			

Dari hasil analisis varian satu arah dapat diinformasikan bahwa :

Diameter tubulus seminiferus dengan $F = 1390,479$ dan signifikansinya $0,000$, maka terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar kelompok.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji BNT. Perhitungan dan hasil uji ini terdapat pada lampiran 16, sedangkan rangkuman hasil uji BNT disajikan pada tabel 5.10

Tabel 5.10 Rangkuman hasil uji BNT diameter tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

	KESIMPULAN
Pasangan kelompok penelitian	Diameter tubulus seminiferus
Kel.kontrol - Kel perlakuan-1	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-2 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna

Dari hasil uji BNT untuk diameter tubulus seminiferus dapat diinformasikan bahwa, terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar dosis pemberian dibuktikan dengan $p = 0,000$ pada masing-masing pasangan kelompok penelitian.

Untuk mengetahui kecenderungan perubahan diameter tubulus seminiferus pada masing-masing dosis (apakah makin besar dosis hasilnya berubah ?) diuji dengan analisis regresi. Perhitungan hasil uji regresi diameter tubulus seminiferus

terdapat pada lampiran 17, sedangkan rangkuman hasil analisa regresi disajikan pada tabel 5.11

Tabel 5.11 Rangkuman hasil analisa regresi diameter tubulus seminiferus

Variabel	B	P
Dosis Phyll.niruri L	$B_1 = -0,6540$	0,1197
Dosis Phyll.niruri L ²	$B^2 = 0,1752$	0,0010
Kontante	$B_0 = 171,7162$	0,000

Hasilnya dapat menunjukkan rumus sebagai berikut (lihat lampiran 17) :

$$Y = a + bx + e ; Y = B_0 + B_1 \times \text{dosis} + B_2 \times \text{dosis}^2$$

$$Y = \text{diameter tubulus seminiferus} = 171,716234 - 0,651058 \times \text{dosis} + 0,175244 \times \text{dosis}^2$$

hasilnya ternyata ada kecenderungan menurun dulu baru meningkat.

5.2.3 Tebal epitel tubulus seminiferus

Dari tabel 5.3. dapat diketahui bahwa tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol lebih kecil dari pada kelompok perlakuan .

Hasil analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 15, rangkuman analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus disajikan pada tabel 5.12

Tabel 5.12 Rangkuman analisis varian satu arah tebal epitel tubulus seminiferus

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	347,330	3	115,777	5433,089	0,000
Didalam kelompok (WG)	0,511	24	0,0002		
Total	347,841	27			

Dari hasil analisis varian satu arah dapat diinformasikan bahwa :

Tebal epitel tubulus seminiferus dengan $F = 5433,089$ dan signifikansinya $0,000$, maka terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar kelompok.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji BNT. Perhitungan dan hasil uji ini terdapat pada lampiran 16 sedangkan rangkuman hasil uji BNT disajikan pada tabel 5.13

Tabel 5.13 Rangkuman hasil uji BNT tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

	KESIMPULAN
Pasangan kelompok penelitian	Tebal epitel tubulus seminiferus
Kel.kontrol - Kel perlakuan-1	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-2 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna

Dari hasil uji BNT untuk tebal epitel tubulus seminiferus dapat diinformasikan bahwa, terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar dosis pemberian dibuktikan dengan $p = 0,000$ pada masing-masing pasangan kelompok penelitian.

Untuk mengetahui kecenderungan perubahan tebal epitel tubulus seminiferus pada masing-masing dosis (apakah makin besar dosis hasilnya berubah ?) diuji dengan analisis regresi. Perhitungan hasil uji regresi tebal epitel

tubulus seminiferus terdapat pada lampiran 17, sedangkan rangkuman hasil analisa regresi disajikan pada tabel 5.14

Tabel 5.14 Rangkuman hasil analisa regresi tebal epitel tubulus seminiferus

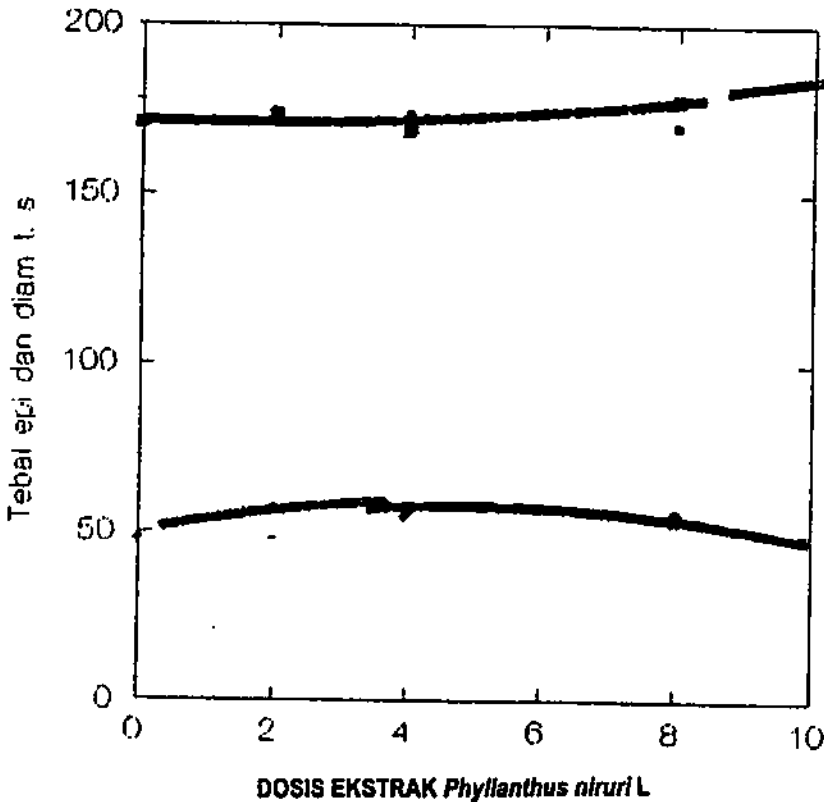
Variabel	B	P
Dosis <i>Phyll.niruri L</i>	$B_1 = 3,6372$	0,000
Dosis <i>Phyll.niruri L</i> ²	$B^2 = -0,3799$	0,000
Kontante	$B_0 = 49,1881$	0,000

Hasilnya dapat menunjukkan rumus sebagai berikut (lihat lampiran 17) :

$$Y = a + bx + e ; Y = B_0 + B_1 \times \text{dosis} + B_2 \times \text{dosis}^2$$

$$Y = \text{Tebal epitel tubulus seminiferus} = 49,1881 + 3,6372 \times \text{dosis} - 0,3779 \times \text{dosis}^2$$

hasilnya ternyata ada kecenderungan menurun dulu baru meningkat



Gambar 5.2.2 Hubungan diameter dan tebal tubulus seminiferus dengan dosis ekstrak *Phyllanthus niruri L*

5.2.4 Jumlah spermatis primer terkoreksi

Dari tabel 5.4 dapat diketahui bahwa jumlah sel spermatis primer terkoreksi pada kelompok kontrol lebih kecil dari pada kelompok perlakuan .

Hasil analisis varian satu arah jumlah sel spermatis primer terkoreksi terdapat pada lampiran, 18 rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatis primer terkoreksi disajikan pada tabel 5.15

Tabel 5.15 Rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatis primer terkoreksi

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	442,010	3	147,337	363,986	0,000
Didalam kelompok (WG)	9,715	24	0,405		
Total	451,725	27			

Dari hasil analisis varian satu arah dapat diinformasikan bahwa :

Jumlah sel spermatis primer terkoreksi dengan $F = 363,968$ dan signifikansinya 0,000, maka terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar kelompok.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji BNT. Perhitungan dan hasil uji ini terdapat pada lampiran 19, sedangkan rangkuman hasil uji BNT disajikan pada tabel 5. 16

Tabel 5.16 Rangkuman hasil uji BNT jumlah sel spermatis primer terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

	KESIMPULAN
Pasangan kelompok penelitian	Jumlah sel spermatis I terkoreksi
Kel.kontrol - Kel perlakuan-1	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-2 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna

Dari hasil uji BNT untuk jumlah sel spermatis primer terkoreksi dapat diinformasikan bahwa, terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar dosis pemberian dibuktikan dengan $p = 0,000$ pada masing-masing pasangan kelompok penelitian.

Untuk mengetahui kecenderungan perubahan jumlah sel spermatis primer terkoreksi pada masing-masing dosis (apakah makin besar dosis hasilnya berubah ?) diuji dengan analisis regresi. Perhitungan hasil uji regresi perubahan jumlah sel spermatis primer terkoreksi terdapat pada lampiran 20, sedangkan rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatis primer terkoreksi disajikan pada tabel 5.17

Tabel 5.17 Rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatosit primer terkoreksi

Variabel	B	P
Dosis Phyll.niruri L	$B_1 = 4,6255$	0,000
Dosis Phyll.niruri L ²	$B^2 = - 05550$	0,000
Kontante	$B_0 = 16,9597$	0,000

Hasilnya dapat menunjukkan rumus sebagai berikut (lihat lampiran 16) :

$$Y = a + bx + e ; Y = B_0 + B_1 \times \text{dosis} + B_2 \times \text{dosis}^2$$

$$Y = \text{jumlah sel spermatosit primer terkoreksi} = 16,9597 + 4,6255 \times \text{dosis} - 0,5550 \times \text{dosis}^2$$

hasilnya ternyata ada kecenderungan meningkat dulu baru menurun

5.2.5 Jumlah sel spermatid terkoreksi

Dari tabel 5.5 dapat diketahui bahwa jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol lebih kecil dari pada kelompok perlakuan .

Hasil analisis varian satu arah sel spermatid terkoreksi terdapat pada lampiran, 18 rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatid terkoreksi disajikan pada tabel 5.18

Tabel 5.18 Rangkuman analisis varian satu arah jumlah sel spermatid terkoreksi

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	4543,396	3	1514,465	128,565	0,000
Didalam kelompok (WG)	282,714	24	11,780		
Total	4826,109	27			

Dari hasil analisis varian satu arah dapat diinformasikan bahwa :

Jumlah sel spermatid terkoreksi dengan $F = 128,565$ dan signifikansinya $0,000$, maka terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar kelompok.

Untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan pada dosis yang berbeda, maka dilanjutkan dengan uji BNT. Perhitungan dan hasil uji ini terdapat pada lampiran 19, sedangkan rangkuman hasil uji BNT disajikan pada tabel 5. 19

Tabel 5.19 Rangkuman hasil uji BNT jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

	KESIMPULAN
Pasangan kelompok penelitian	Jumlah sel spermatid terkoreksi
Kel.kontrol - Kel perlakuan-1	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel.kontrol - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-2	Sangat bermakna
Kel perlakuan-1 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna
Kel perlakuan-2 - Kel perlakuan-3	Sangat bermakna

Dari hasil uji BNT untuk jumlah sel spermatid terkoreksi dapat diinformasikan bahwa, terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar dosis pemberian dibuktikan dengan $p = 0,000$ pada masing-masing pasangan kelompok penelitian.

Untuk mengetahui kecenderungan perubahan jumlah sel spermatid terkoreksi pada masing-masing dosis (apakah makin besar dosis hasilnya berubah ?) diuji dengan analisis regresi. Perhitungan hasil uji regresi perubahan jumlah sel

spermatid terkoreksi terdapat pada lampiran 20, sedangkan rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatid terkoreksi disajikan pada tabel 5.20

Tabel 5.20 Rangkuman hasil analisis regresi jumlah sel spermatid terkoreksi

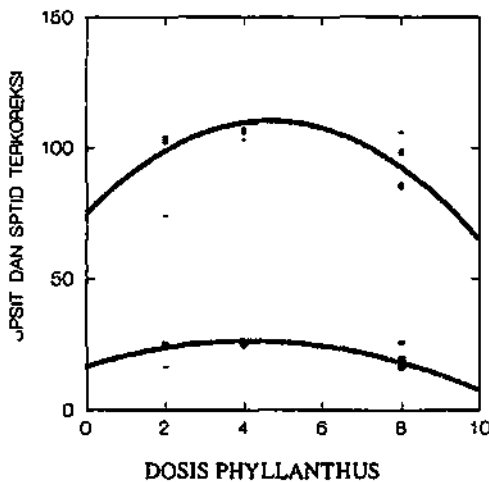
Variabel	B	P
Dosis <i>Phyll.niruri L</i>	$B_1 = 14,9648$	0,000
Dosis <i>Phyll.niruri L</i> ²	$B_2 = - 1,5954$	0,000
Kontante	$B_0 = 75,1287$	0,000

Hasilnya dapat menunjukkan rumus sebagai berikut (lihat lampiran 16) :

$$Y = a + bx + e ; Y = B_0 + B_1 \times \text{dosis} + B_2 \times \text{dosis}^2$$

$$Y = \text{jumlah sel spermatid terkoreksi} = 75,1287 + 14,9680 \times \text{dosis} - 1,5935 \times \text{dosis}^2$$

hasilnya ternyata ada kecenderungan meningkat mulai dosis 2 mg/ 0,1 dan menurun lagi pada dosis 8 mg/ 0,1 ml ekstrak *Phyllanthus niruri L*



Gambar 5.2.3 Hubungan jumlah sel spermatis primer terkoreksi dan spermatid terkoreksi dengan dosis ekstrak *Phyllanthus niruri L*

5.2.6 Berat badan mencit

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna, dilakukan analisis varian satu arah. Hasil analisis varian satu arah berat badan mencit awal dan akhir terdapat pada lampiran 21, sedangkan rangkuman analisis varian satu arah berat badan mencit disajikan pada tabel 5.21.

Tabel 5.21 Rangkuman analisis varian satu arah berat badan mencit awal

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	0,750	3	0,250	1,050	0,389
Didalam kelompok (WG)	5,714	24	0,238		
Total	6,464	27			

Rangkuman analisis varian satu arah berat badan mencit akhir

Sumber varian	JK	dk	KT	F	P
Antar kelompok (BG)	15,329	3	5,110	0,787	0,513
Didalam kelompok (WG)	155,780	24	6,491		
Total	171,109	27			

Berat badan mencit awal $F = 1,050$ dengan $p = 0,389$, disimpulkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok kontrol penelitian. Berat badan mencit akhir $F = 0,787$ dengan $p = 0,513$, disimpulkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok penelitian.

Pada uji korelasi untuk melihat hubungan antar variabel moderator dengan variabel tergantung yang terdapat pada lampiran 22, oleh karena p lebih besar dari 0,05 disimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna, artinya bahwa berat badan mencit bukan merupakan variabel pengganggu (confounding variable).

BAB 6

PEMBAHASAN

Phyllanthus niruri L adalah tanaman obat yang berfungsi sebagai imunomodulator, tepatnya sebagai imunostimulator. Ekstrak tanaman ini digunakan jangka panjang dalam terapi imun terhadap infeksi virus terutama hepatitis B, sehingga diperkirakan akan mempengaruhi aktivitas sel imunokompeten diberbagai organ termasuk organ reproduksi khususnya organ reproduksi pria yang sampai saat ini masih belum diketahui efeknya baik pada manusia atau pada hewan. Penelitian Ma'at (1997) pemberian per-oral ekstrak tanaman ini pada mencit, menunjukkan pengaruhnya pada fungsi dan aktivitas sistem imun. Yang dipengaruhi yaitu peningkatan aktivitas monosit/ makrofag pada fungsi fagositosis, kemotaksis dan sekresi beberapa sitokin. Salah satu sitokin tersebut adalah TNF- α yang disekresi oleh limfosit Th-1. TNF- α dapat mengaktifasi monosit/ makrofag untuk mensekresi IL-1, IL-6 dan TNF- α itu sendiri .

Khan et al (1987), IL-1 banyak disekresi oleh sel Sertoli dan sel germinal pada tikus dewasa. Aktivitas IL-1 terutama pada proliferasi sel selama spermatogenesis berlangsung.

Dwight et al (1990), TNF- α dan IL-1 meningkatkan produksi testosteron pada tikus dewasa melalui pengaruhnya pada makrofag atau langsung pada sel Leydig.

Kretser (1995), Seperti diketahui bahwa testosteron diproduksi oleh sel Leydig dalam jaringan interstisial testis. Testosteron ini berfungsi pada individu

jantan untuk perkembangan tanda kelamin primer dan sekunder serta proses spermatogenesis. Perubahan kadar testosteron dalam testis diketahui dapat menyebabkan perubahan pada proses spermatogenesis

Huleihel (1996), peningkatan kadar sitokin pada reaksi inflamasi hanya terdapat pada plasma semen yang diproduksi oleh glandula asesori, sehingga tidak mengganggu spermatogenesis.

Benahmed (1997) ; Nehar et al (1997) didalam gonad TNF- α disekresi oleh makrofag jaringan interstisial dan sel germinal dalam tubulus seminiferus memberikan signal kepada sel Sertoli utnuk meningkatkan produksi asam laktat. Asam laktat tersebut berguna untuk metabolisme sel germinal. Dapat disimpulkan bahwa TNF- α berperan penting pada fungsi testis seperti spermatogenesis, disamping proses steroidogenesis dan interaksinya dengan sistem imun.

Wang (1998), fagositosis badan residu akan memicu sel Sertoli untuk memproduksi IL-1 yang secara autokrin merangsang spermatogenesis.

Pada penelitian ini yang ingin diketahui adalah apakah pemberian per-oral ekstrak tanaman ini pada beberapa dosis tertentu (peningkatan) yaitu 2 mg, 4 mg dan 8 mg/ 0,1 ml selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis mencit/ *Mus musculus*) akan mempengaruhi proses spermatogenesis.

Masa terbesar pembentuk testis adalah tubulus seminiferus. Epitel tubulus seminiferus tersusun atas 2 jenis sel yaitu sel Sertoli dan sel germinal dalam berbagai stadia. Sel germinal jumlahnya jauh lebih banyak melalui proliferasi dan diferensiasi yang komplek hingga akhirnya menjadi spermatozoa. Lapisan sel germinal yang paling dekat dengan membrana basalis adalah sel spermatogonia, satu atau beberapa lapis diatasnya adalah spermatosit dan akhirnya gerombolan

spermatid menempati daerah dekat lumen. Sel tersebut terorganisasi dalam susunan sel yang berbatas jelas untuk tiap-tiap tahapan perkembangan proses spermatogenesis. Tahapan itu berurutan dari waktu ke waktu disebut siklus epitel seminiferus (Leblond and Clermont, 1952).

Perubahan jumlah sel yang berasosiasi pada tahap tertentu dapat dijadikan indikator adanya gangguan pada spermatogenesis. Satu sel spermatosit primer akan membelah menjadi 4 sel spermatid. Hal ini tercapai bila kadar testosteron intratestikular yang cukup, tetapi bila kadar testosteron terlalu tinggi dalam sirkulasi darah, akan memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi LH dan FSH (Tienhoven, 1983).

Didalam tubulus seminiferus testosteron diperlukan untuk perkembangan sel spermatosit menjadi spermatid (Noris, 1980), untuk proliferasi dan diferensiasi sel germinal (Ross and Reith, 1985), tahap awal dan akhir spermatogenesis (Hadley, 1992) dan pada tahap spermiogenesis (Ganong, 1993). Menurut Nalbandov (1990), terdapat korelasi positif antara berat testis dengan produksi testosteron. Bila oleh karena pemberian obat atau zat tertentu yang dapat mempengaruhi spermatogenesis maka akan terjadi perubahan pada saat pembelahan atau perkembangan dari sel epitel germinal sampai menjadi spermatozoa. Perubahan proses spermatogenesis secara histologi dapat dilihat dari jumlah dan ukuran sel penyusun tubuli seminiferi. Perubahan keadaan ini akan mempengaruhi dari ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus.

Berdasar pada landasan teoritis dan empiris tersebut diatas, pemberian peroral Ekstrak *Phyllanthus niruri* L. menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi testosteron. Peningkatan testosteron ini didalam tubulus seminiferus menyebabkan

terjadinya rangsangan proses spermatogenesis, yang diwakili melalui pengamatan berat testis, diameter tubulus seminiferus, tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi.

Pada penelitian ini terlihat pada foto sediaan mikroskopis semua sel intinya nampak sedang aktif terjadi proses pembelahan.

Berat testis

Menurut Nalbandov (1990) terdapat korelasi positif antar berat testis dengan produksi testosteron, tetapi pada penelitian ini peningkatan berat testis tidak bermakna. Testis merupakan organ genitalia yang terpenting. Tubulus seminiferus merupakan bagian penyusun testis terbesar (Tienhoven, 1983). Hal ini menentukan berat testis. Bila ada perubahan pada diameter tubulus seminiferus dan tebal epitel tubulus seminiferus akan mempengaruhi berat testis. Hasil pengukuran berat testis kanan dan kiri menunjukkan peningkatan dibanding dengan kontrol, terutama pada testis kiri. (tabel 5.1 dan lampiran 11), Pada anova satu arah hasilnya terdapat perbedaan bermakna pada berat testis kiri, tetapi hasilnya tidak terdapat perbedaan yang bermakna berat testis kanan. Walaupun hanya 2 pasangan kelompok terdapat perbedaan yang bermakna pada testis kiri pada uji BNT (tabel 5.8). Dengan demikian disimpulkan pemberian ekstrak tanaman ini dengan variasi dosis yang berbeda tidak mempengaruhi berat testis kanan. Ini menunjukkan bahwa dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L yang diberikan (2, 4 dan 8 mg/ 0,1 ml selama 54 hari) tidak menyebabkan hambatan produksi testosteron, karena tidak terdapat penurunan pada penimbangan berat testis.

Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus.

Adanya perubahan pada saat pembelahan menyebabkan jumlah sel germinal akan menjadi berkurang atau bertambah. Penurunan testosteron didalam tubulus seminiferus akan menyebabkan terjadinya gangguan saat meiosis I yaitu terbentuknya sel spermatosit sekunder yang akhirnya gangguan terbentuknya spermatid (Suhadi, 1989). Hal ini salah satu sebab terjadinya penurunan diameter tubulus seminiferus. Pada penelitian ini, dengan pemberian variasi dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L menyebabkan peningkatan diameter tubulus seminiferus (tabel 5.2 , lampiran 11 dan gambar 5.1.3). Terlihat mula-mula terjadi peningkatan pada dosis 2 mg/ 0,1 ml kemudian sedikit menurun pada dosis 4 mg/ 0,1 ml dan meningkat lagi pada dosis 8 mg/ 0,1 ml. Semakin besar dosis tidak berkorelasi positif dengan semakin meningkatnya diameter tubulus seminiferus. Hasil analisis varian satu arah menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat bermakna antar kelompok penelitian (lampiran 15), dan pada uji BNT terdapat perbedaan yang bermakna antar dosis pemberian.(lampiran 16). Juga pada analisis regresi terdapat kecenderungan menurun dulu baru meningkat (gambar 5.2.2).

Tebal epitel tubulus seminiferus

Demikian juga seperti pada diameter tubulus seminiferus, tebal epitel ini tergantung dari jumlah sel penyusunnya, makin banyak jumlahnya akan makin tebal ukurannya. Pada penelitian ini pemberian variasi dosis ekstrak tanaman ini terlihat semakin meningkat (tabel 5.3 dan gambar 5.2.2). Hal ini terlihat pada hasil analisis varian satu arah yang menunjukkan terdapat perbedaan tebal epitel tubulus seminiferus yang sangat bermakna pada antar kelompok penelitian

(lampiran 15). Salah satu penyebabnya adalah terjadinya penambahan sel penyusun tubulus seminiferus yaitu spermatosit primer dan spermatid. Terdapat perbedaan yang bermakna antar dosis pemberian pada uji BNT (lampiran 16). Pada analisis regresi terdapat kecenderungan meningkat dulu baru menurun (gambar 5.2.2 dan lampiran 17). Baik pada Diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus terdapat kecenderungan meningkat walaupun tidak langsung. Hal ini disebabkan oleh karena dari segi imunologi pemberian per-oral *Phyllanthus niruri* L, tidak akan meningkatkan sekresi TNF- α yang berlebihan dibuktikan pada percobaan invitro dengan perangsangan lipopolisakarida (LPS). Sehingga diperkirakan tidak terdapat perbedaan yang bermakna sekresi TNF- α pada kelompok perlakuan dengan pemberian peningkatan dosis ekstrak *Phyllanthus niruri* L. Pada pemberian per-oral *Phyllanthus niruri* L juga terjadi peningkatan aktivitas kemotaksis dan fagositosis monosit/ makrofag (Ma'at, 1997). Hal ini juga sesuai dengan peneliti terdahulu Khan et al. (1987); Dwight et al (1990); Nehar et al (1997); Benahmed (1997) dan Wang et al (1998) yang telah disebutkan diatas. Diduga terjadi modulasi TNF- α pada steroidogenesis dan spermatogenesis yang sampai saat ini belum diketahui mekanisme kerjanya untuk itu perlu penelitian lebih lanjut, dengan demikian pengaruh TNF- α yang diduga menghambat spermatogenesis dapat dieliminasi. Sampai seberapa jauh meningkatnya aktivitas monosit/ makrofag akibat pemberian ekstrak *phyllanthus niruri* L perlu diteliti lebih lanjut, yang pada penelitian ini hanya efek akhirnya saja yang terlihat yaitu meningkatnya spermatogenesis.

Dosis imunomodulator sama sekali tidak mengikuti kadar dosis normal, berarti semakin tinggi dosis bukan berarti semakin tinggi respon yang diperoleh

(White Site, 1992), jadi dosis sangat dipengaruhi oleh faktor individu dan spesies oleh karena itu pada pengamatan diameter tubulus seminiferus menunjukkan menurun dulu baru meningkat dan pada tebal epitel tubulus seminiferus cenderung meningkat, baru kemudian menurun, tetapi pada dasarnya ada peningkatan baik diameter maupun tebal epitel tubulus seminiferus secara bermakna.

Jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid terkoreksi

Bila dilihat perbandingan antara sel spermatosit primer terkoreksi dan sel spermatid terkoreksi pada kelompok kontrol dan perlakuan adalah 1 : 4, dapat langsung disimpulkan bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* L tidak menghambat pembelahan sel (mitosis dan meiosis), seperti diketahui bila ada hambatan pada fase pembelahan maka 1 sel spermatosit primer tidak akan membelah menjadi 4 sel spermatid, tetapi akan kurang dari itu. Testosteron sangat berperan pada fase pembelahan meiosis sehingga pada pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L ini dapat disimpulkan merangsang sekresi testosteron intratestikular mencit, untuk itu perlu penelitian lebih lanjut.

Dengan meningkatnya jumlah sel germinal dapat diasumsikan akan meningkatkan fertilitas, untuk itu perlu diteliti lebih lanjut.

Dari hasil perhitungan menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi pada kelompok perlakuan mengalami peningkatan dibanding dengan kelompok kontrol (tabel 5.5 dan lampiran 11). Melalui pengujian data dengan analisis varian satu arah dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan jumlah spermatosit primer secara bermakna

diantara kelompok penelitian (tabel 5.4 dan lampiran 18). Pada uji BNT terdapat perbedaan yang bermakna antar perlakuan dosis pemberian (tabel 5.16 dan tabel 5,19). Pada analisis regresi (tabel 5.17, tabel 5.20 dan gambar 5.2.3) terlihat meningkat hingga mencapai puncaknya pada dosis 4 mg/0,1 ml kemudian menurun lagi pada dosis 8 mg/ 0,1 ml, hal ini sesuai dengan pendapat White Site (1992). Pada penelitian ini nampak perkembangan sel germinal yang meningkat, terlihat dengan meningkatnya jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi secara statisik bermakna sesuai dengan peneliti yang kami sebutkan diatas.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut :

Pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri* L pada dosis 2,4,8 mg/ 0,1 ml selama 54 hari pada mencit (*Mus musculus*) meningkatkan proses spermatogenesis yang pada pengamatan histologi diwakili oleh peningkatan berat testis kiri, ukuran diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus serta jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi, tetapi tidak berpengaruh pada berat testis kanan.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian in, maka perlu dipertimbangkan :

Perlunya penelitian lebih lanjut tentang mekanisme kerja TNF- α dalam mempengaruhi aktivitas monosit/ makrofag serta besarnya sekresi TNF- α , yang pada penelitian ini tampak adanya peningkatan spermatogenesis yang diakibatkan oleh meningkatnya sekresi TNF- α dan meningkatnya aktivitas monosit/ makrofag.

Perlunya diteliti lebih lanjut sampai seberapa jauh peningkatan kadar testosteron intratestikular oleh karena pengaruh ekstrak *Phyllanthus niruri* L terhadap sel Leydig. Yang tampak pada penelitian ini jelas pengaruh peningkatan kadar testosteron menyebabkan proses spermatogenesis berjalan dengan baik.

Peningkatan jumlah sel germinal diasumsikan dengan peningkatan kesuburannya sesuai dengan tujuan penelitian ini, sehingga kemungkinan

terbukalah penelitian lebih lanjut penggunaan ekstrak tanaman ini untuk mengatasi masalah infertilitas akibat gangguan proses spermatogenesis dengan memperhatikan efek samping yang mungkin ditimbulkannya.

Pemikiran lain bahwa dengan pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri* L menyebabkan peningkatan proses spermatogenesis, ini disebabkan oleh karena meningkatnya daya tahan tubuh. Oleh karena tanaman obat ini adalah imunostimulator, dengan meningkatnya daya tahan tubuh, individu tersebut semakin sehat, dan semua organ berfungsi lebih baik, termasuk organ reproduksi sehingga proses spermatogenesis akan berjalan lebih baik. Sehingga perlu penelitian lebih lanjut tentang peningkatan daya tahan tubuh oleh karena ekstrak tanaman ini memperbaiki respon imun didalam tubuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander NJ and Anderson DJ, 1987. Immunology of semen. **Fertility and Sterility** 47: 192-20
- Baratawidjaya KG, 1991. **Imunologi dasar**. edisi ke 2. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Bardin C, Cheng CY, Musto NA and Gonsalves GL, 1988. **The Sertoli cell in the Physiology of Reproduction**. Raven Press Ltd. New York. P; 920-925.
- Beckerman KP, 1997. Reproduction and The Immune System. In Stites DP, Terr Abba I, Parslow Tristran G (editor) **Medical Immunology** 9th edition. Appleton & lange. p: 613-30
- Benahmed M, 1997. Role of tumor necrosis factor in the male gonad. **Contracept Fertil Sex** 25: 569-71
- Bennet JP and Vickery BH, 1970. Rats and Mice in Hafez, ESE (editor) **Reproduction and Breeding Techniques for laboratory Animal** . Lea and Febiger Philadelphia. p: 299-315.
- Cohen EP and Pollard JW, 1998. Normal sexual function in male mice lacking a functional type I IL-1 receptor. **Endocrinology** 139 : 815 - 818
- Dellman HD dan Brown EM, 1992. **Buku teks Histologi Veteriner**. vol. II. Terjemahan Hartono. Penerbit UI-Press Jakarta.
- Damber JE, Maddocks S, Widmark A, Bergh A, 1992. Testicular blood flow and vasomotion can be maintained by testosterone in Leydig cell-depleted rats. **Int J Androl** 15 : 385-93

- de Kretser DM., Mc Lachlan RI., Robertson DM and Wreford NG, 1992. Control of Spermatogenesis by follicle stimulating hormone and testosterone. **Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism** 6: 335-54
- de Kretser DM, 1987. Local regulation of testicular function. **International review of cytology** 109: 89-112.
- de Kretser DM, 1995. **Principles and practice of endocrinology and metabolism**. 2nd edition. JB. Lippincott company. Philadelphia. p: 1032-43
- de Kretser DM and Kerr JB, 1988. **The Cytology of testis in the physiology of reproduction** (edited by: Knobil, E., Neill, J., Ewing, II and Green wald, GS.). Raven Press Ltd. New York. P : 837-916.
- Dwight W Warren, Vijaya P, Yin Lu, Barbara W Platler and Richard Horton, 1990. **Journal of andrology** 11: 353 - 59
- Ferdinandus IA, 1980. **Spermatogenesis ditinjau dari segi Histologi**. In : Posiding seminar spermatogenesis.(Editor oleh KM. Arsyad) Surabaya., Desember. p: 1-16.
- Hales DB, 1992. IL-1 inhibit Leydig rat cell streoidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hidroxylyase/ C 17-20 Lyase cytochrome P450 expression. **Endocrinology** 131: 2165-72
- Ganong WF, 1993. **Review of medical physiology**. 16th. ed. Prentice Hall Massachusetts. P: 234-235
- Hadley EM, 1992. **Endocrinology**. Willey Eastern Private Ltd. New Delhi. P : 119, 190.
- Hardjopranyoto S, 1995. **Ilmu Kemajiran pada ternak**. Surabaya : Airlangga University Press

- Hafez ESE, 1993. **Spermatozoa and seminal plasma**. In *Reproduction in farm animal*. Sixth ed. Lea and Febiger USA. P: 165-179.
- Hess Rex A, 1990. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium : Light microscopic observations of perfusion-fixed and plastics- embedded testes. **Biology Reproduction** 43: 525-542
- Huleihel M, Linenfeld E, Levy A, Potashnik G and Glezerman M, 1996. Distinct expression levels of cytokines and soluble cytokine receptors in seminal plasma of fertile and infertile men. **Fertility and Sterility** 66 : 135-139
- Hume CW, 1972. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animal**. 4th edition. Churchill, livingstone, Edinburg and London. p: 199-204
- Hutson JC, 1993. Secretion of TNF- α by testicular macrophage. **J. Reprod. immunology** 23 : 63-72
- Inslar V and L. Biwno, 1993. **Infertility : male and female**, chenchi II Living stone , London
- Johnson M and Everit B. 1988. **Essensial Reproductive**. Blackwell scientific Publ. Melbourne.
- Kern S, Robertson S., Mau VJ and Maddocks S, 1995. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. **Biol Reprod** 53 : 1407-16
- Khan SA., Soder O, Syed V, Gustafsson L, Lindh M and Ritzen EM, 1987. The rat testis produces large amounts of interleukin-1- like factor. **Int J Andrology** 10 : 495 - 503.

- Lameschow S, Hosmer DW, Klar J and Lwanga KS, 1990. **Adequacy of Sample size in health studies**. New York. John Wiley & Sons.
- Leblond CP and Clermont Y, 1952. Defenition of stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences** 55 : 548-72
- Ma'at S, 1997. *Phyllanthus niruri* L sebagai imunostimulator pada mencit. **Disertasi**, Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Maekawa K, Ji Zs and Abe SI, 1995. Proliferation of New Spermatogonia by mamalian FSH via Sertoli cells in vivo. **Journ. of Experimental Zoology**. 272 : 5.
- Materia Medika, 1987. **Monografi *Phyllanthus niruri* L**. jilid II. p: 77-82
- Moore C and Hutson JC, 1994 Physiological relevance of TNF secretion in mediating macrophage-Leydig cell interaction. **Endocrinology** 134: 63-69
- Morrisette N, Elizabeth G and Aderem A, 1999. Meeting report : The macrophage - a cell for all seasons. **Trends in cell biology** 9: 199-201
- Nehar D, Mauduit C, Boussonar F, Benahmed M, 1997. **Endocrinology**. 138 : 1964-71
- Nalbandov AV, 1990. **Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas** . Penerjemah Sunaryo Keman. Edisi ke-3. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Noris DO, 1980. **Vertebrate Endocrinology**. Lea and Febiger. Philadelpia. p : 114-115
- Raugh R, 1968. **The Mouse : its Reproduction and Development**. Burgess Publ. co. Minneapolis.

- Suhadi K, 1989. Pengaruh regulasi diabetes mellitus terhadap profil spermogram, hormon reproduksi dan potensi seks pria. **Disertasi**. Program pascasarjana Universitas Airlangga.
- Thwaites JC and Hannan GD, 1989. **The effect of frequency of ejaculation under nutrition on the size and tone of the Rams testis**. Animal reproduction science. Elsevier science publishers. Amsterdam. 19 : 29-35.
- Tienhoven A, 1983. **Reproductive Physiology of vertebrate**. 2nd Ed. Cornell University Press. Ithaca London. p : 91-93.
- Tjokronegoro A, 1999. **Respons imun tubuh terhadap infeksi didalam sistem reproduksi pria**. seminar penatalaksanaan infertilitas.
- Wang JE, Josefsen GM., Hansson V and Haigen TB, 1998. Residual bodies and IL-1 α stimulate expression of mRNA for IL-1 α and IL-1 receptor type I in cultured rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology** 137 : 139-144
- White site L Teresa, 1992. Immun cell function. In Noel R Rose and Everly de Macario (editor). **Manual of clinical laboratory immunology**. IV edition. American society for microbiology. P : 201-31
- Xiong Y and Hales DB, 1993. The role of tumor necrosis factor - alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. **Endocrinology** 132: 2438-44
- Xiong Y and Hales DB, 1993. Expression, regulation and production of tumor necrosis factor - alpha in mouse testicular interstitial macrophages in vitro. **Endocrinology** 133: 2568-73

Lampiran 1 : Berat badan mencit pada saat dimulai penelitian dan setelah penelitian (gram)

	Berat badan mula-mula	Berat badan setelah penelitian
K-1	24	25,9905
K-2	24,5	28,9379
K-3	25	32,7040
K-4	23,5	28,7990
K-5	24,5	26,7072
K-6	25	28,7749
K-7	24,5	29,0160
P-1.1	23,5	28,5000
P-1.2	24	31,7258
P-1.3	24,5	33,1856
P-1.4	25	28,5599
P-1.5	24	28,9283
P-1.6	24,5	27,7436
P-1.7	24	32,3216
P-2.1	24	27,3262
P-2.2	25	31,8942
P-2.3	25	28,6136
P-2.4	24,5	35,9139
P-2.5	25	25,8580
P-2.6	24	33,9087
P-2.7	25	29,7987
P-3.1	24,5	28,2070
P-3.2	25	32,2607
P-3.3	25	28,5080
P-3.4	24	29,9668
P-3.5	24	29,9668
P-3.6	24,5	26,8034
P-3.7	25	27,4941

Lampiran 2 : Berat testis mencit setelah penelitian (54 hari) dalam gram

	Berat testis kiri	Berat testis kanan
K-1	0,0998	0,1042
K-2	0,0857	0,1862
K-3	0,0868	0,1134
K-4	0,1011	0,1077
K-5	0,0934	0,1014
K-6	0,0837	0,0936
K-7	0,0962	0,1062
P-1.1	0,0884	0,0900
P-1.2	0,0872	0,0920
P-1.3	0,1122	0,1146
P-1.4	0,0883	0,0917
P-1.5	0,1049	0,1067
P-1.6	0,0764	0,0914
P-1.7	0,0811	0,0857
P-2.1	0,1082	0,1165
P-2.2	0,1003	0,1024
P-2.3	0,0830	0,0940
P-2.4	0,0920	0,1130
P-2.5	0,0987	0,0996
P-2.6	0,0827	0,0930
P-2.7	0,1085	0,1110
P-3.1	0,0985	0,1008
P-3.2	0,1367	0,1418
P-3.3	0,1142	0,1151
P-3.4	0,1030	0,1127
P-3.5	0,1007	0,1107
P-3.6	0,1040	0,1087
P-3.7	0,1382	0,1515

Lampiran 3a : Diameter tub.seminiferus pada kelompok kontrol (mikron)

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	137,5	200	137,5	187,5	150	187,5	187,5
2	150	225	192,5	187,5	175	192,5	175
3	137,5	162,5	137,5	137,5	187,5	170	187,5
4	125	162,5	162,5	162,5	162,5	187,5	157,5
5	137,5	192,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5
6	162,5	170	187,5	167,5	150	162,5	237,5
7	150	187,5	175	162,5	192,5	187,5	162,5
8	167,5	182,5	187,5	187,5	170	187,5	170
9	187,5	187,5	157,5	167,5	187,5	175	162,5
10	175	182,5	137,5	187,5	182,5	150	187,5
11	187,5	137,5	187,5	175	187,5	167,5	175
12	157,5	125	137,5	167,5	187,5	182,5	167,5
13	187,5	137,5	162,5	182,5	137,5	187,5	182,5
14	162,5	162,5	192,5	157,5	187,5	162,5	150
15	175	187,5	167,5	162,5	167,5	157,5	162,5
16	187,5	150	192,5	175	162,5	137,5	187,5
17	175	162,5	175	150	162,5	162,5	162,5
18	225	150	192,5	175	150	150	187,5
19	237,5	167,5	187,5	167,5	167,5	175	137,5
20	162,5	182,5	187,5	182,5	187,5	162,5	167,5
21	170	162,5	162,5	150	175	175	150
22	162,5	162,5	187,5	162,5	165	167,5	175
23	225	175	150	175	162,5	182,5	150
24	175	187,5	162,5	187,5	175	150	157,5
25	150	167,5	150	162,5	150	167,5	145

**Lampiran 3b : Diameter tubulus seminiferus pada kelompok Perlakuan -1
(mikron)**

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	187,5	187,5	180	187,5	180	180	187,5
2	195	170	167,5	150	160	180	177,5
3	187,5	167,5	157,5	187,5	180	157,5	180
4	200	180	175	180	187,5	175	187,5
5	187,5	190	187,5	157,5	180	160	175
6	150	180	170	157,5	157,5	180	187,5
7	150	165	187,5	175	175	187,5	180
8	180	150	177,5	187,5	160	187,5	187,5
9	157,5	157,5	167,5	180	180	167,5	175
10	175	175	180	177,5	180	180	160
11	160	180	157,5	160	177,5	190	180
12	180	187,5	175	180	167,5	180	160
13	177,5	187,5	160	167,5	157,5	165	157,5
14	167,5	167,5	180	157,5	175	150	175
15	157,5	180	175	175	187,5	175	160
16	175	190	160	187,5	150	185	180
17	187,5	165	170	170	175	160	177,5
18	170	187,5	187,5	187,5	185	160	175
19	187,5	175	175	187,5	157,5	180	160
20	175	185	175	170	175	177,5	170
21	175	185	155	187,5	187,5	180	187,5
22	175	170	187,5	175	170	175	175
23	175	160	187,5	175	187,5	167,5	175
24	162,5	175	175	167,5	175	157,5	155
25	145	155	170	155	175	187,5	150

**Lampiran 3c : Diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan - 2
(mikron)**

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	192,5	170	175	175	175	165	172,5
2	175	175	157,5	170	170	175	180
3	187,5	157,5	187,5	175	175	175	192,5
4	162,5	142,5	155	162,5	162,5	187,5	187,5
5	180	170	160	177,5	177,5	170	200
6	172,5	165	167,5	150	180	180	187,5
7	150	175	165	175	170	187,5	175
8	192,5	180	167,5	165	175	162,5	167,5
9	187,5	175	162,5	175	165	180	165
10	200	167,5	180	175	175	180	175
11	175	165	187,5	187,5	180	170	157,5
12	187,5	152,5	162,5	155	187,5	175	142,5
13	155	187,5	180	175	162,5	162,5	155
14	170	175	167,5	157,5	180	177,5	150
15	175	170	165	187,5	172,5	157,5	167,5
16	157,5	175	165	170	150	142,5	165
17	142,5	162,5	175	170	165	155	152,5
18	155	177,5	187,5	165	175	165	175
19	150	155	187,5	175	187,5	187,5	175
20	147,5	187,5	167,5	187,5	155	162,5	187,5
21	147,5	162,5	165	165	170	180	180
22	192,5	180	167,5	167,5	155	172,5	175
23	170	187,5	165	165	167,5	150	157,5
24	167,5	175	167,5	155	170	165	142,5
25	162,5	167,5	165	165	152,5	167,5	170

**Lampiran 3d : Diameter tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan - 3
(mikron)**

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	167,5	175	187,5	175	187,5	162,5	175
2	187,5	175	182,5	150	187,5	187,5	167,5
3	170	187,5	175	157,5	187,5	192,5	170
4	157,5	157,5	200	175	180	187,5	175
5	162,5	162,5	150	175	175	182,5	162,5
6	200	175	187,5	200	187,5	175	187,5
7	212,5	187,5	157,5	162,5	157,5	187,5	175
8	187,5	182,5	150	187,5	170	157,5	187,5
9	187,5	187,5	175	182,5	187,5	162,5	182,5
10	187,5	182,5	155	187,5	187,5	200	175
11	212,5	175	162,5	157,5	170	157,5	187,5
12	180	187,5	150	192,5	187,5	187,5	157,5
13	150	157,5	182,5	187,5	182,5	182,5	170
14	212,5	187,5	182,5	157,5	170	187,5	170
15	150	182,5	200	162,5	187,5	157,5	187,5
16	175	192,5	200	200	182,5	187,5	175
17	177,5	187,5	175	157,5	170	175	157,5
18	155	182,5	187,5	200	170	175	187,5
19	162,5	175	157,5	187,5	180	162,5	182,5
20	167,5	187,5	200	212,5	187,5	192,5	170
21	200	180	212,5	175	157,5	187,5	195
22	175	175	200	170	180	182,5	187,5
23	187,5	162,5	212,5	157,5	182,5	187,5	187,5
24	187,5	180	150	192,5	170	157,5	187,5
25	137,5	162,5	162,5	187,5	170	175	175

Lampiran 4a : Tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok kontrol

(mikron)

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	40	50	50	50	42,5	50	50
2	42,5	45	37,5	50	50	62,5	37,5
3	37,5	50	45	50	50	55	50
4	45	37,5	37,5	50	45	50	45
5	37,5	50	42,5	50	42,5	55	50
6	50	57,5	50	57,5	50	55	62,5
7	42,5	50	50	45	57,5	50	62,5
8	50	45	45	37,5	50	37,5	55
9	50	55	50	50	45	55	55
10	50	55	62,5	42,5	55	50	50
11	42,5	50	50	50	55	37,5	37,5
12	50	50	50	50	45	45	45
13	57,5	37,5	45	50	37,5	45	37,5
14	50	50	42,5	50	45	50	37,5
15	45	50	50	50	37,5	42,5	50
16	50	50	50	50	50	37,5	50
17	50	50	50	42,5	62,5	50	50
18	50	45	42,5	45	50	50	62,5
19	55	50	50	50	62,5	50	55
20	50	50	50	45	50	42,5	37,5
21	50	50	50	50	50	37,5	45
22	50	50	42,5	50	37,5	55	45
23	62,5	37,5	57,5	42,5	37,5	50	50
24	50	45	55	50	50	50	42,5
25	50	50	50	50	45	42,5	45

**Lampiran 4b : Tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan -1
(mikron)**

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	67,5	50	45	60	50	50	70
2	67,5	50	57,5	50	70	70	62,5
3	70	55	50	57,5	62,5	62,5	50
4	62,5	50	75	50	57,5	50	62,5
5	75	50	50	50	50	50	50
6	50	70	75	50	50	57,5	60
7	50	62,5	50	50	50	50	75
8	45	50	50	57,5	50	50	57,5
9	50	62,5	50	60	50	57,5	50
10	50	67,5	62,5	75	45	60	75
11	60	50	62,5	60	50	75	62,5
12	75	45	50	70	50	50	50
13	62,5	62,5	57,5	62,5	50	50	45
14	55	50	75	50	60	57,5	50
15	42,5	70	62,5	62,5	75	57,5	50
16	62,5	75	50	50	62,5	55	70
17	50	50	70	50	75	62,5	62,5
18	57,5	62,5	62,5	50	62,5	60	57,5
19	50	50	75	60	62,5	75	50
20	50	62,5	50	75	65	50	50
21	57,5	50	50	50	50	62,5	50
22	62,5	60	50	70	60	50	60
23	65	50	50	62,5	50	62,5	75
24	50	60	50	57,5	60	55	62,5
25	50	75	57,5	50	75	62,5	50

**Lampiran 4c : Tebal epitel tubulus seminiferus pada kelompok perlakuan -2
(mikron)**

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	50	50	50	57,5	50	62,5	50
2	62,5	57,5	55	57,5	60	55	60
3	62,5	57,5	60	55	62,5	60	50
4	50	57,5	50	60	55	50	57,5
5	62,5	50	57,5	50	60	57,5	55
6	52,5	55	55	57,5	50	57,5	62,5
7	50	60	50	50	55	57,5	50
8	57,5	57,5	50	62,5	60	50	50
9	55	55	60	50	57,5	60	57,5
10	62,5	60	50	62,5	55	50	52,5
11	75	50	57,5	52,5	62,5	62,5	50
12	62,5	52,5	52,5	50	50	50	62,5
13	55	62,5	50	55	62,5	50	62,5
14	60	50	57,5	62,5	52,5	62,5	50
15	50	50	55	62,5	50	57,5	62,5
16	57,5	50	57,5	50	57,5	55	55
17	50	57,5	55	62,5	55	62,5	60
18	57,5	52,5	62,5	57,5	62,5	50	50
19	57,5	50	75	62,5	60	50	57,5
20	50	52,5	55	50	57,5	55	62,5
21	45	50	62,5	55	52,5	60	50
22	50	50	62,5	50	50	50	62,5
23	50	57,5	50	50	50	57,5	57,5
24	50	50	50	50	62,5	57,5	55
25	55	50	55	57,5	50	57,5	50

Lampiran 4d : Tebal epitel tubulus seminiferus pada perlakuan - 3 (mikron)

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	62,5	72,5	50	42,5	55	55	50
2	55	62,5	75	70	50	70	50
3	50	67,5	55	50	55	50	50
4	50	67,5	62,5	70	50	50	42,5
5	50	70	50	55	42,5	62,5	42,5
6	55	50	42,5	55	62,5	55	50
7	55	50	50	62,5	70	50	70
8	62,5	42,5	50	55	50	55	50
9	55	42,5	55	52,5	50	50	50
10	50	50	75	50	42,5	62,5	62,5
11	55	50	62,5	50	55	42,5	42,5
12	50	42,5	55	50	52,5	50	55
13	60	42,5	52,5	50	62,5	50	50
14	50	50	50	42,5	62,5	55	55
15	37,5	42,5	55	70	50	55	62,5
16	62,5	55	50	42,5	50	62,5	55
17	57,5	55	55	50	42,5	55	52,5
18	62,5	62,5	50	50	50	50	70
19	50	62,5	55	55	50	55	50
20	62,5	50	50	55	55	50	62,5
21	50	55	50	62,5	70	50	50
22	60	55	42,5	55	62,5	62,5	62,5
23	55	62,5	42,5	55	50	55	55
24	52,5	50	70	62,5	55	55	52,5
25	50	50	55	50	50	55	62,5

Lampiran 5a : Jumlah sel spermatosit primer pada kelompok kontrol

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	41	39	44	60	76	57	34
2	51	60	37	60	40	52	60
3	32	45	42	67	52	43	60
4	34	42	38	69	54	34	67
5	51	46	39	76	51	52	69
6	60	79	52	40	34	76	34
7	60	88	76	52	57	40	32
8	67	71	40	54	32	60	34
9	69	67	45	38	38	60	31
10	76	72	42	47	54	67	46
11	40	69	38	49	52	69	79
12	38	34	38	51	76	42	58
13	38	32	76	38	40	46	67
14	45	41	40	52	67	79	69
15	37	46	42	34	69	32	76
16	46	38	46	51	76	34	40
17	38	38	79	60	40	31	33
18	54	42	67	38	38	42	34
19	52	34	69	48	49	46	46
20	45	31	76	38	34	79	60
21	56	60	40	38	31	38	45
22	37	40	45	38	60	32	36
23	67	43	36	31	45	34	37
24	46	34	45	60	36	31	45
25	55	45	45	45	37	60	42



Lampiran 5b : Jumlah sel spermatosit primer pada kelompok perlakuan – 1

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	53	70	41	37	43	43	41
2	43	71	75	39	53	53	74
3	43	75	43	41	42	42	78
4	53	70	53	65	41	60	41
5	42	75	42	37	41	41	49
6	70	46	75	75	57	43	75
7	75	40	57	43	59	43	43
8	73	36	64	43	41	53	43
9	61	39	41	53	49	50	53
10	74	43	49	41	67	70	42
11	41	61	53	37	64	60	41
12	57	37	42	61	41	46	70
13	59	43	43	53	62	61	75
14	41	53	53	42	61	37	46
15	49	60	75	65	43	43	41
16	41	41	53	46	53	43	46
17	37	53	42	46	75	53	75
18	51	42	43	64	46	42	70
19	38	43	43	70	43	50	75
20	46	43	53	75	43	46	46
21	40	53	42	46	53	75	46
22	51	42	75	43	42	70	44
23	55	53	46	53	57	60	41
24	42	42	37	42	59	46	49
25	43	46	39	61	42	46	41

Lampiran 5c : Jumlah sel spermatosit primer pada kelompok perlakuan – 2

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	60	53	60	37	60	42	60
2	55	59	70	38	53	60	66
3	58	44	55	42	53	50	60
4	47	52	42	60	50	59	63
5	39	54	42	59	42	50	64
6	72	55	60	57	60	59	68
7	60	67	50	59	60	55	52
8	70	73	59	53	59	60	53
9	71	59	37	53	60	60	55
10	69	60	38	42	60	66	42
11	41	60	42	60	60	60	60
12	52	50	60	60	60	65	72
13	41	50	53	59	60	65	59
14	51	42	53	60	61	38	60
15	53	42	60	60	59	42	53
16	53	60	70	70	60	60	53
17	39	50	50	71	55	59	39
18	37	59	72	60	60	61	37
19	60	60	60	53	60	69	38
20	42	53	70	53	59	62	42
21	60	50	50	39	53	60	60
22	72	60	53	60	53	53	65
23	59	50	60	60	53	38	53
24	66	71	70	53	40	45	53
25	71	66	61	75	53	60	39

Lampiran 5d : Jumlah sel spermatosit primer pada kelompok perlakuan – 3

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	58	55	52	54	58	69	40
2	69	51	47	52	69	46	45
3	40	54	61	58	38	50	70
4	50	52	51	69	40	45	51
5	38	47	54	40	39	50	54
6	53	60	40	50	70	47	50
7	51	57	45	38	50	51	50
8	65	61	70	58	58	54	54
9	56	55	65	69	69	50	52
10	45	59	46	40	38	52	47
11	55	58	38	50	50	47	61
12	36	34	51	58	41	60	60
13	44	47	54	69	51	54	65
14	64	50	54	39	54	52	44
15	40	54	52	50	52	47	50
16	41	52	58	44	58	58	48
17	47	47	58	52	69	69	51
18	48	61	69	47	38	42	54
19	40	60	35	60	61	50	52
20	40	56	50	47	60	44	58
21	70	61	50	36	65	61	69
22	71	35	60	60	39	58	47
23	73	51	60	61	54	69	50
24	70	54	55	60	52	45	52
25	60	52	47	65	48	50	50

Lampiran 6a : Jumlah sel spermatid pada kelompok kontrol

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	106	108	97	97	107	112	95
2	88	125	95	132	88	97	97
3	110	99	98	130	107	132	132
4	112	95	112	107	85	107	112
5	99	105	97	85	76	88	97
6	98	97	132	76	95	97	132
7	89	132	107	98	98	107	112
8	96	130	88	95	98	88	97
9	99	109	97	98	97	88	107
10	103	100	88	95	132	110	85
11	97	112	95	98	130	112	76
12	89	97	98	98	132	95	107
13	101	107	88	107	88	98	88
14	100	132	97	88	110	98	95
15	107	107	107	110	112	97	94
16	85	88	109	97	125	132	94
17	100	88	97	88	99	130	107
18	110	95	132	110	95	88	97
19	109	98	130	112	95	97	100
20	101	98	88	97	120	107	100
21	110	90	117	132	97	107	110
22	107	97	112	130	107	109	97
23	132	88	119	112	110	97	110
24	130	100	110	97	100	108	95
25	130	112	97	117	107	110	88

Lampiran 6b : Jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan – 1

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	72	122	104	91	103	71	94
2	112	108	112	80	86	91	98
3	94	110	104	87	78	80	104
4	98	98	83	104	86	87	112
5	104	111	91	83	83	86	104
6	112	85	100	86	94	112	83
7	105	101	83	101	98	104	86
8	113	65	92	91	104	109	78
9	87	83	90	86	112	86	83
10	120	84	96	91	104	91	86
11	71	104	98	91	112	80	78
12	91	122	108	80	104	94	86
13	80	104	112	87	83	98	91
14	87	103	100	112	101	104	80
15	74	91	84	104	91	112	87
16	106	80	87	83	91	104	83
17	118	91	103	94	80	98	104
18	125	80	112	98	87	86	83
19	107	87	104	104	83	108	71
20	104	83	83	112	125	104	91
21	83	94	78	125	104	83	95
22	86	98	104	104	91	100	87
23	78	104	103	100	91	112	125
24	86	112	91	108	100	104	98
25	83	78	80	98	107	110	104

Lampiran 6c : Jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan – 2

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	58	75	138	130	121	93	88
2	102	98	74	101	106	76	110
3	111	75	93	72	98	78	82
4	122	93	88	65	130	74	138
5	121	76	70	130	101	98	94
6	106	117	82	76	98	130	93
7	98	105	138	121	130	101	76
8	120	111	93	106	101	112	121
9	101	99	76	98	92	74	106
10	131	102	101	120	93	93	98
11	88	98	72	101	76	76	74
12	93	130	138	106	101	74	93
13	80	101	74	98	72	93	96
14	99	72	93	100	76	106	117
15	114	106	121	76	74	78	98
16	72	98	106	88	93	114	86
17	65	130	98	70	76	93	121
18	67	74	130	74	117	121	106
19	88	100	101	93	138	106	98
20	70	97	88	76	85	105	130
21	82	94	93	108	88	98	101
22	118	93	76	85	70	104	72
23	85	76	138	121	94	93	65
24	113	101	74	106	93	116	67
25	112	92	93	98	96	117	88

Lampiran 6d : Jumlah sel spermatid pada kelompok perlakuan – 3

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	98	80	173	128	71	81	130
2	128	117	127	85	123	102	80
3	85	98	71	81	127	111	86
4	77	106	99	115	130	124	128
5	106	99	128	80	100	120	85
6	173	105	80	66	116	81	77
7	127	119	124	124	66	72	99
8	145	100	120	116	128	121	137
9	99	98	116	100	85	128	81
10	137	100	99	124	97	85	72
11	118	85	128	77	124	81	76
12	85	107	85	99	120	130	124
13	74	99	77	101	116	80	120
14	115	137	72	72	66	66	106
15	80	81	71	91	128	127	173
16	66	85	124	124	85	99	127
17	73	81	99	120	97	128	124
18	81	94	128	100	99	85	120
19	72	111	106	124	85	77	116
20	71	124	123	130	87	173	94
21	124	120	122	100	99	127	128
22	120	130	72	68	106	130	85
23	116	80	71	123	128	80	81
24	130	116	124	127	127	66	72
25	90	120	100	96	80	116	71

**Lampiran 7a : Diameter inti sel spermatosit primer pada kelompok kontrol
(mikron)**

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	5	5	8,75	5	6,25	5	5
2	7,5	8,75	5	7,5	7,5	5	8,75
3	6,25	8,75	5	5	6,25	7,5	8,75
4	7,5	8,75	7,5	7,5	7,5	6,25	5
5	6,25	5	7,5	7,5	7,5	7,5	5
6	6,25	6,25	6,25	7,5	5	6,25	6,25
7	6,25	6,25	5	5	5	7,5	5
8	6,25	5	6,25	5	6,25	5	5
9	8,75	6,25	6,25	6,25	7,5	5	8,75
10	6,25	5	6,25	5	6,25	7,5	8,75
11	5	5	6,25	5	5	5	6,25
12	5	6,25	6,25	6,25	5	7,5	5
13	5	6,25	6,25	7,5	7,5	5	5
14	5	5	8,75	7,5	5	6,25	3,75
15	7,5	5	8,75	6,25	6,25	7,5	5
16	6,25	5	8,75	5	5	5	6,25
17	6,25	5	5	7,5	5	6,25	6,25
18	7,5	5	5	5	7,5	5	8,75
19	6,25	3,75	5	7,5	7,5	5	8,75
20	5	5	6,25	5	5	5	5
21	6,25	5	7,5	6,25	5	6,25	5
22	5	3,75	5	5	6,25	6,25	7,5
23	7,5	6,25	6,25	5	7,5	6,25	5
24	5	6,25	5	5	5	7,5	5
25	6,25	5	5	5	5	7,5	6,25
26	7,5	5	5	7,5	7,5	7,5	6,25
27	7,5	6,25	6,25	5	5	6,25	6,25
28	5	8,75	5	8,75	5	7,5	5
29	5	8,75	5	5	6,25	6,25	5
30	6,25	8,75	6,25	5	5	7,5	5
31	6,25	8,75	5	5	7,5	7,5	8,75
32	6,25	8,75	6,25	5	7,5	5	8,75
33	5	5	5	5	6,25	5	5
34	6,25	3,75	6,25	8,75	6,25	5	3,75
35	5	3,75	7,5	7,5	5	5	5
36	6,25	6,25	5	7,5	7,5	5	5
37	5	5	6,25	7,5	5	5	6,25
38	5	6,25	6,25	6,25	5	5	6,25
39	6,25	5	5	5	5	5	5
40	6,25	5	6,25	6,25	7,5	7,5	5

Lampiran 7b : Diameter inti sel spermatosit primer pada kelompok perlakuan-1 (mikron)

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	7,5	5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
2	7,5	5	7,5	7,5	5	6,25	5
3	7,5	5	7,5	7,5	5	7,5	5
4	5	7,5	7,5	6,25	5	5	5
5	5	7,5	7,5	5	5	7,5	7,5
6	5	5	7,5	5	5	7,5	7,5
7	5	7,5	7,5	5	7,5	7,5	7,5
8	5	7,5	7,5	5	7,5	5	5
9	7,5	5	5	8,75	5	7,5	5
10	7,5	7,5	5	5	7,5	7,5	7,5
11	7,5	5	7,5	5	5	5	7,5
12	7,5	5	7,5	6,25	7,5	5	7,5
13	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5	6,25	7,5
14	7,5	5	5	6,25	7,5	6,25	5
15	7,5	5	5	6,25	7,5	7,5	7,5
16	5	6,25	5	6,25	5	7,5	7,5
17	5	6,25	7,5	6,25	7,5	7,5	5
18	7,5	7,5	7,5	8,75	5	7,5	5
19	7,5	7,5	5	7,5	5	7,5	5
20	5	7,5	5	7,5	7,5	5	7,5
21	5	7,5	5	7,5	5	6,25	5
22	5	7,5	5	6,25	5	6,25	5
23	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5	7,5	5
24	7,5	7,5	5	5	7,5	5	7,5
25	5	7,5	7,5	5	5	6,25	7,5
26	7,5	7,5	5	8,75	7,5	6,25	5
27	7,5	5	7,5	7,5	7,5	5	7,5
28	7,5	7,5	5	7,5	5	5	5
29	7,5	5	5	6,25	7,5	7,5	7,5
30	7,5	5	5	6,25	7,5	7,5	7,5
31	5	6,25	7,5	7,5	5	7,5	7,5
32	5	7,5	7,5	6,25	7,5	6,25	7,5
33	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
34	5	5	5	7,5	5	7,5	7,5
35	5	7,5	5	6,25	5	5	5
36	5	7,5	7,5	7,5	5	7,5	5
37	7,5	7,5	7,5	5	7,5	5	7,5
38	7,5	7,5	5	7,5	7,5	7,5	7,5
39	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
40	7,5	7,5	7,5	5	7,5	6,25	7,5

Lampiran 7c : Diameter inti sel spermatosit primer pada kelompok Perlakuan-2 (mikron)

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	8,75	7,5	5	7,5	7,5	7,5	7,5
2	7,5	5	7,5	7,5	5	7,5	7,5
3	5	7,5	6,25	5	7,5	6,25	5
4	7,5	7,5	6,25	5	7,5	6,25	5
5	8,75	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
6	8,75	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
7	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	6,25
8	8,75	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
9	8,75	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
10	5	5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
11	7,5	6,25	5	7,5	5	6,25	7,5
12	7,5	7,5	6,25	7,5	7,5	6,25	7,5
13	7,5	5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
14	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	5
15	6,25	7,5	7,5	7,5	5	7,5	6,25
16	6,25	5	7,5	5	7,5	6,25	6,25
17	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
18	7,5	7,5	6,25	7,5	7,5	6,25	7,5
19	7,5	5	7,5	5	7,5	6,25	7,5
20	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
21	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	5
22	6,25	7,5	6,25	5	7,5	6,25	7,5
23	6,25	7,5	7,5	5	5	6,25	7,5
24	6,25	6,25	7,5	5	7,5	7,5	5
25	5	7,5	7,5	7,5	5	7,5	5
26	6,25	5	5	7,5	7,5	7,5	7,5
27	6,25	7,5	6,25	7,5	7,5	6,25	7,5
28	7,5	6,25	5	7,5	5	6,25	7,5
29	7,5	7,5	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5
30	5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	5
31	6,25	7,5	5	7,5	7,5	7,5	7,5
32	6,25	7,5	6,25	7,5	5	6,25	5
33	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
34	5	6,25	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
35	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	7,5
36	6,25	7,5	7,5	5	5	7,5	5
37	6,25	7,5	7,5	5	7,5	7,5	7,5
38	6,25	6,25	7,5	5	5	7,5	7,5
39	7,5	7,5	5	7,5	7,5	7,5	7,5
40	7,5	5,	5	5	5	7,5	7,5

**Lampiran 7d : Diameter inti sel spermatosit primer pada kelompok
Perlakuan-3 (mikron)**

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	7,5	10	7,5	7,5	8,75	5	5
2	8,75	7,5	8,75	7,5	8,75	8,75	6,25
3	10	7,5	7,5	5	8,75	8,75	8,75
4	8,75	6,25	10	5	6,25	8,75	8,75
5	7,5	8,75	8,75	7,5	8,75	8,75	6,25
6	6,25	10	10	7,5	8,75	6,25	8,75
7	6,25	8,75	7,5	7,5	5	6,25	8,75
8	6,25	8,75	8,75	7,5	6,25	5	8,75
9	7,5	7,5	6,25	5	8,75	5	8,75
10	8,75	5	7,5	7,5	8,75	6,25	8,75
11	10	7,5	8,75	7,5	8,75	6,25	5
12	8,75	7,5	6,25	5	5	6,25	8,75
13	8,75	7,5	7,5	7,5	8,75	8,75	8,75
14	8,75	7,5	5	5	6,25	8,75	6,25
15	7,5	10	6,25	7,5	8,75	8,75	6,25
16	7,5	7,5	7,5	5	8,75	8,75	6,25
17	7,5	8,75	8,75	7,5	8,75	8,75	8,75
18	6,25	7,5	7,5	7,5	5	8,75	8,75
19	6,25	7,5	8,75	5	8,75	8,75	5
20	7,5	8,75	8,75	7,5	5	5	6,25
21	7,5	8,75	7,5	5	6,25	6,25	6,25
22	6,25	5	8,75	7,5	8,75	6,25	8,75
23	6,25	7,5	7,5	5	8,75	6,25	8,75
24	6,25	6,25	7,5	7,5	5	8,75	6,25
25	7,5	7,5	7,5	7,5	6,25	8,75	7,5
26	7,5	7,5	7,5	5	6,25	8,75	5
27	5	7,5	6,25	7,5	6,25	8,75	8,75
28	8,75	5	6,25	7,5	8,75	8,75	8,75
29	8,75	10	7,5	7,5	8,75	8,75	8,75
30	8,75	7,5	7,5	7,5	8,75	8,75	5
31	5	7,5	7,5	7,5	5	8,75	8,75
32	5	7,5	7,5	5	8,75	8,75	5
33	5	8,75	7,5	5	6,25	8,75	8,75
34	8,75	10	7,5	7,5	5	5	8,75
35	8,75	7,5	7,5	5	8,75	6,25	8,75
36	7,5	6,25	7,5	7,5	8,75	8,75	8,75
37	6,25	6,25	5	7,5	8,75	8,75	8,75
38	8,75	7,5	7,5	7,5	6,25	8,75	5
39	5	5	6,25	5	8,75	6,25	8,75
40	5	5	7,5	5	8,75	6,25	7,5

Lampiran 8a : Diameter inti sel spermatid pada kelompok kontrol (mikron)

	K-1	k-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	2,5	1,25	2,5	2,5	1,25	1,875	1,25
2	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25
3	2,5	1,875	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25
4	2,5	1,875	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875
5	2,5	1,875	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
6	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875	2,5	1,875
7	1,25	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	1,875
8	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875	1,25
9	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875	1,875	1,875
10	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5
11	2,5	2,5	1,875	1,25	2,5	2,5	1,875
12	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	2,5	1,25
13	1,25	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5
14	1,25	2,5	2,5	1,875	1,25	2,5	2,5
15	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,875	1,875
16	1,25	1,25	2,5	2,5	1,875	1,875	1,25
17	1,25	1,875	1,875	1,25	2,5	2,5	2,5
18	1,25	1,875	1,875	1,875	2,5	1,875	2,5
19	2,5	2,5	1,875	1,875	2,5	1,25	2,5
20	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5
21	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875	1,25	2,5
22	2,5	1,875	1,25	2,5	1,25	1,875	2,5
23	2,5	1,875	2,5	2,5	1,25	1,875	1,875
24	2,5	1,875	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5
25	1,25	1,25	2,5	1,875	1,875	2,5	2,5
26	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5
27	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875	2,5	2,5
28	1,25	1,25	2,5	2,5	1,875	2,5	1,875
29	2,5	2,5	2,5	1,875	2,5	1,875	1,875
30	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	1,875	1,25
31	2,5	1,875	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25
32	2,5	2,5	1,875	2,5	1,25	2,5	2,5
33	1,25	2,5	2,5	1,875	2,5	2,5	2,5
34	1,25	2,5	2,5	1,875	1,875	2,5	2,5
35	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25
36	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875	1,875
37	2,5	1,875	2,5	1,875	2,5	2,5	1,875
38	2,5	1,875	1,875	1,875	2,5	2,5	2,5
39	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	1,875	2,5
40	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875	1,25	2,5

**Lampiran 8b : Diameter inti sel spermatid pada kelompok perlakuan-1
(mikron)**

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	2,5
2	1,875	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5
3	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5	1,875
4	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25
5	1,875	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25	2,5
6	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	1,875	1,875
7	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25	1,875	1,875
8	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,875
9	1,875	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	2,5
10	2,5	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	1,875
11	2,5	1,25	1,875	1,25	2,5	1,875	2,5
12	1,25	1,875	2,5	1,25	2,5	2,5	2,5
13	1,875	1,875	1,25	1,875	2,5	2,5	2,5
14	1,875	1,875	1,875	2,5	2,5	1,25	2,5
15	1,875	1,25	2,5	1,25	2,5	1,875	2,5
16	1,875	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5
17	1,25	1,25	2,5	1,25	2,5	1,875	1,875
18	1,25	1,875	2,5	2,5	2,5	1,25	2,5
19	1,25	1,25	2,5	1,875	2,5	2,5	1,25
20	2,5	1,25	1,875	2,5	2,5	2,5	1,875
21	2,5	1,25	1,25	2,5	2,5	1,25	2,5
22	1,25	1,875	1,875	2,5	2,5	1,25	2,5
23	1,25	1,875	2,5	2,5	2,5	2,5	1,25
24	1,875	1,875	1,25	2,5	1,25	2,5	2,5
25	1,875	1,875	2,5	1,25	1,25	2,5	2,5
26	2,5	2,5	2,5	1,875	1,25	1,875	2,5
27	2,5	1,25	2,5	2,5	1,875	1,875	1,875
28	2,5	1,25	1,875	2,5	1,875	2,5	2,5
29	2,5	1,25	1,875	2,5	1,875	1,25	1,875
30	2,5	1,25	1,875	2,5	1,875	2,5	1,25
31	2,5	2,5	1,25	1,25	2,5	2,5	1,875
32	2,5	2,5	1,25	1,875	1,875	1,25	1,875
33	2,5	2,5	2,5	1,875	1,875	1,875	1,25
34	2,5	2,5	2,5	2,5	1,875	2,5	1,25
35	1,875	2,5	2,5	2,5	1,875	1,875	1,25
36	1,875	1,875	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
37	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
38	1,25	1,875	1,875	2,5	2,5	2,5	2,5
39	1,25	1,25	1,875	2,5	2,5	2,5	1,25
40	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25

Lampiran 8c : Diameter inti sel spermatid pada kelompok perlakuan-2

(mikron)

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	1,25	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	1,25
2	1,25	1,875	2,5	1,25	1,875	1,25	1,25
3	1,25	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25
4	1,875	1,875	2,5	1,25	1,25	1,25	1,875
5	1,875	1,25	2,5	1,25	1,875	1,25	1,875
6	1,875	2,5	1,875	1,25	1,875	1,25	1,875
7	2,5	1,875	1,25	1,25	2,5	2,5	1,875
8	2,5	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	1,875
9	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	2,5
10	1,875	1,875	1,25	2,5	1,875	2,5	2,5
11	2,5	1,25	2,5	2,5	1,875	2,5	1,875
12	2,5	1,875	1,875	2,5	1,875	2,5	1,875
13	1,25	1,875	1,875	1,875	2,5	2,5	1,875
14	1,25	2,5	1,875	1,875	2,5	2,5	1,25
15	1,875	2,5	1,875	1,875	1,25	2,5	1,25
16	1,875	1,875	1,25	1,875	1,25	1,875	1,25
17	1,875	1,25	1,25	1,875	2,5	1,875	1,875
18	1,25	1,25	2,5	1,25	1,875	1,25	1,875
19	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875	1,25	1,25
20	1,25	2,5	1,25	1,25	1,875	1,25	1,875
21	1,25	1,875	2,5	1,25	1,25	1,875	1,25
22	1,25	1,875	2,5	1,25	2,5	1,875	1,25
23	1,875	1,25	2,5	1,875	1,875	1,25	1,25
24	1,25	1,25	1,25	1,875	1,875	1,25	1,875
25	1,25	2,5	1,25	1,25	1,875	1,25	1,875
26	1,25	1,25	1,875	2,5	1,25	1,25	2,5
27	1,25	1,875	1,875	2,5	1,25	1,25	2,5
28	1,875	1,875	1,25	2,5	1,25	1,875	1,875
29	1,875	1,25	1,25	2,5	2,5	1,875	1,875
30	1,875	1,25	1,25	1,875	1,875	1,875	1,25
31	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875	1,25	1,25
32	1,25	1,25	1,875	1,25	1,875	1,25	2,5
33	2,5	1,25	1,875	1,25	1,875	1,25	2,5
34	2,5	1,875	1,25	1,25	1,875	2,5	1,875
35	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5	1,875
36	1,875	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25	1,25
37	2,5	2,5	2,5	1,875	1,25	1,25	2,5
38	1,25	1,875	1,875	2,5	1,25	1,25	1,875
39	2,5	2,5	1,25	2,5	1,25	2,5	1,875
40	2,5	1,875	1,875	2,5	1,25	1,25	2,5

**Lampiran 8d : Diameter inti sel spermatid pada kelompok perlakuan -3
(mikron)**

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	2,5	1,25	2,5	1,25	1,25	2,5	1,25
2	1,875	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25
3	1,875	1,875	1,25	2,5	1,25	1,25	2,5
4	2,5	1,875	2,5	1,25	1,875	1,25	2,5
5	2,5	1,875	2,5	1,25	1,875	1,25	1,875
6	2,5	2,5	1,25	2,5	2,5	1,875	2,5
7	1,875	1,875	2,5	2,5	2,5	1,875	1,25
8	1,875	1,875	2,5	1,875	1,875	1,25	1,25
9	1,875	1,25	2,5	1,25	1,875	1,25	2,5
10	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25	1,875
11	2,5	2,5	1,875	2,5	1,25	1,25	1,875
12	1,25	1,875	1,875	1,25	2,5	2,5	2,5
13	1,25	1,875	1,25	1,25	2,5	2,5	1,25
14	1,25	1,25	1,875	2,5	1,25	1,25	1,25
15	1,25	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25
16	1,875	1,875	2,5	2,5	1,25	1,25	1,25
17	1,875	2,5	2,5	2,5	1,25	1,25	1,875
18	1,875	1,875	1,875	1,875	1,875	2,5	1,25
19	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25
20	1,25	1,875	1,25	1,25	1,875	1,25	1,25
21	1,25	1,875	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25
22	1,875	1,25	1,25	2,5	1,25	1,25	1,25
23	1,875	1,875	1,875	1,25	1,25	1,25	1,875
24	1,25	1,875	1,875	2,5	1,875	1,25	2,5
25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5
26	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5
27	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5	1,875
28	1,875	1,25	1,875	1,25	1,25	1,875	1,25
29	2,5	1,875	1,25	2,5	1,25	2,5	1,25
30	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25
31	1,875	1,875	1,25	1,875	1,875	1,25	1,875
32	1,875	2,5	1,875	1,25	1,25	1,25	1,25
33	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	1,875	1,25
34	1,25	1,875	1,25	1,25	2,5	1,875	1,25
35	1,25	1,25	1,875	1,25	1,25	1,25	2,5
36	1,875	1,875	1,25	2,5	1,25	1,25	1,875
37	1,875	1,25	2,5	2,5	1,25	1,875	1,875
38	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25	1,25
39	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
40	1,25	2,5	1,25	1,25	1,875	2,5	1,25

Lampiran 9a : Jumlah sel Sertoli pada kelompok kontrol

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7
1	10	10	7	7	11	9	10
2	12	11	8	9	10	12	9
3	11	10	7	9	10	11	10
4	10	10	10	8	12	7	9
5	7	12	10	11	8	8	11
6	5	7	9	8	9	10	10
7	5	9	8	9	11	12	12
8	7	7	8	10	9	11	8
9	8	7	9	9	11	10	10
10	6	12	9	10	8	8	7
11	9	6	10	8	7	10	9
12	10	11	8	7	10	8	8
13	11	7	9	9	8	9	8
14	10	9	11	11	8	6	8
15	8	12	8	10	8	9	7
16	7	7	8	8	10	8	9
17	9	7	9	9	8	9	11
18	12	10	11	10	9	7	8
19	11	10	12	10	8	8	8
20	12	9	10	8	7	7	10
21	11	8	9	9	9	8	9
22	7	8	8	9	10	9	9
23	12	9	8	8	9	8	10
24	10	9	9	10	7	12	9
25	8	10	11	10	10	9	8

Lampiran 9b : Jumlah sel Sertoli pada kelompok perlakuan – 1

	P-1.1	P-1.2	P-1.3	P-1.4	P-1.5	P-1.6	P-1.7
1	7	6	6	5	4	7	5
2	6	5	6	4	6	6	7
3	4	5	7	4	5	5	7
4	4	6	5	6	6	7	5
5	5	10	5	4	6	7	7
6	10	5	4	7	6	10	6
7	7	5	5	6	4	6	7
8	6	6	5	7	10	7	6
9	5	5	7	7	5	5	6
10	7	10	7	6	7	6	7
11	5	6	10	5	7	7	6
12	4	5	5	7	6	5	5
13	5	5	4	6	7	6	5
14	5	7	10	5	7	7	5
15	4	6	6	7	6	5	7
16	7	6	7	5	6	8	6
17	8	7	6	4	6	7	8
18	7	8	5	8	7	6	7
19	11	8	10	7	6	8	7
20	7	7	7	7	8	6	7
21	7	6	7	9	8	5	5
22	8	6	5	7	5	7	4
23	6	5	7	9	6	5	7
24	7	7	8	6	9	6	8
25	5	6	5	7	6	6	7

Lampiran 9c : Jumlah sel Sertoli pada kelompok perlakuan – 2

	P-2.1	P-2.2	P-2.3	P-2.4	P-2.5	P-2.6	P-2.7
1	7	6	7	6	6	5	6
2	10	6	7	7	8	7	7
3	10	8	7	6	8	7	7
4	9	6	6	7	8	7	5
5	10	7	6	6	7	5	6
6	6	7	6	6	7	8	8
7	7	6	7	6	5	6	7
8	7	6	5	6	7	10	8
9	6	6	5	6	7	5	6
10	5	7	6	7	8	6	6
11	6	7	6	5	6	7	5
12	6	6	5	6	7	8	7
13	6	7	7	5	6	7	6
14	5	6	6	7	6	5	6
15	8	7	10	8	6	7	6
16	5	7	6	7	5	7	6
17	5	6	7	6	6	6	7
18	4	5	7	8	7	7	6
19	6	6	7	6	5	6	5
20	5	5	7	7	6	5	7
21	5	6	7	7	5	5	6
22	7	7	8	6	7	6	7
23	4	7	5	6	7	7	6
24	5	6	6	9	5	6	8
25	7	10	7	6	5	6	7

Lampiran 9d : Jumlah sel Sertoli pada kelompok perlakuan – 3

	P-3.1	P-3.2	P-3.3	P-3.4	P-3.5	P-3.6	P-3.7
1	10	7	10	6	7	10	7
2	11	10	9	7	6	7	6
3	8	8	7	6	6	9	8
4	7	8	11	9	7	6	12
5	9	9	8	6	6	7	10
6	12	6	8	6	8	8	7
7	10	6	11	7	10	7	6
8	12	7	10	10	7	6	8
9	10	10	6	7	8	12	7
10	10	10	10	11	9	8	5
11	9	7	12	9	8	7	6
12	10	8	9	7	8	9	7
13	7	10	7	6	9	7	6
14	8	8	7	11	8	7	9
15	8	10	7	6	7	10	7
16	7	8	5	8	7	8	6
17	5	6	7	7	6	8	7
18	8	6	8	10	7	8	10
19	8	5	6	7	7	9	12
20	5	10	9	8	8	8	7
21	4	7	7	11	7	10	12
22	4	9	6	10	7	6	8
23	6	7	6	8	12	7	6
24	6	8	7	8	6	8	7
25	5	10	8	9	7	5	10

Lampiran 10 : Penghitungan jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi
Penghitungan jumlah Sel spermatosit primer terkoreksi

$$T \text{ kontrol} = 49,4286 \times \frac{5}{5 + 9,7571} = 49,4286 \times 0,3388 = 16,7464$$

$$T \text{ perlakuan - 1} = 51,0968 \times \frac{5}{5 + 10,4286} = 51,0968 \times 0,3241 = 16,559$$

$$T \text{ perlakuan - 2} = 55,9143 \times \frac{5}{5 + 10,9571} = 55,9143 \times 0,3133 = 17,5202$$

$$T \text{ perlakuan - 3} = 52,9143 \times \frac{5}{5 + 12,1057} = 52,9143 \times 0,2923 = 15,4609$$

Penghitungan jumlah sel Spermatid terkoreksi

$$T \text{ kontrol} = 104,3428 \times \frac{5}{5 + 2,0748} = 104,3428 \times 0,7067 = 73,7426$$

$$T \text{ perlakuan-1} = 95,9828 \times \frac{5}{5 + 1,9712} = 95,9828 \times 0,7172 = 68,8424$$

$$T \text{ perlakuan-2} = 96,7429 \times \frac{5}{5 + 1,7791} = 96,7429 \times 0,7376 = 71,3538$$

$$T \text{ perlakuan-3} = 103,6228 \times \frac{5}{5 + 1,7231} = 103,6228 \times 0,7437 = 77,0647$$

Sertoli correcting factor

$$\text{Sertoli correcting factor} = \frac{\text{jumlah inti sel Sertoli kontrol}}{\text{jumlah inti sel Sertoli perlakuan}}$$

$$\text{SCF kontrol} = \frac{9,0743}{9,0743} = 1$$

$$\text{SCF perlakuan-1} = \frac{9,0743}{6,3143} = 1,4371$$

$$\text{SCF perlakuan-2} = \frac{9,0743}{6,4629} = 1,4041$$

$$\text{SCF perlakuan-3} = \frac{9,0743}{7,96} = 1,14$$

Hasil akhir jumlah sel spermatosit primer terkoreksi :

Kel. kontrol	= 16,7464 X 1	= 16,7464 dibulatkan menjadi 17
Kel. P-1	= 16,559 X 1,4371	= 23,7971 dibulatkan menjadi 24
Kel. P-2	= 17,5202 X 1,4041	= 24,6001 dibulatkan menjadi 25
Kel. P-3	= 15,4609 X 1,14	= 17,6327 dibulatkan menjadi 18

Hasil akhir jumlah sel spermatid terkoreksi :

Kel. Kontrol	= 73,7426 X 1	= 73,7426 dibulatkan menjadi 74
Kel. P-1	= 68,8424 X 1,4371	= 98,9334 dibulatkan menjadi 99
Kel. P-2	= 71,3538 X 1,4041	= 100,1879 dibulatkan menjadi 100
Kel. P-3	= 77,0647 X 1,14	= 87,8538 dibulatkan menjadi 88

Lampiran 11

Data rata-rata berat badan awal, berat badan akhir, berat testis kiri dan kanan, diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus, jumlah sel spermatosit primer, spermatid dan sel Sertoli pada kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan-1 (P-1), perlakuan-2 (P-2) dan perlakuan-3 (P-3)

Kelompok	Nomor mencit	BB awal gram	BB akhir gram	berat testis kiri (gram)	berat testis kanan (gram)	diameter tubulus sem. (mikron)	tebal epitel tubulus sem. (mikron)	jumlah spermatosit primer	diameter inti spermatosit primer (mikron)	jumlah spermatid	diameter inti spermatid (mikron)	jumlah sel Sertoli
kontrol (K) 0,1 ml NaCl 0,9 %	1	24	25,9905	0,0998	0,1042	170,8	48,3	49	9,75	103	2,0938	9
	2	24,5	28,9379	0,0857	0,1862	170,6	48,4	49	9,7	104	2,0563	9
	3	25	32,7040	0,0868	0,1134	170,6	48,2	49	9,8	104	2,1238	9
	4	23,5	28,7990	0,1011	0,1077	170,7	48,1	49	9,8	104	2,0313	9
	5	24,5	26,7072	0,0934	0,1014	170,8	48,1	50	9,75	104	2,0781	9
	6	25	28,7749	0,0837	0,0936	171	48	49	9,75	104	2,0938	9
	7	24,5	29,0160	0,0962	0,1062	170,9	48,3	49	9,75	104	2,0468	9
rata-rata		24,4286	28,7042	0,0924	0,1161	170,7714	48,2	49	9,7571	104	2,0748	9
Perlakuan-1 (P-1) 2 mg/0,1 ml ekstrak Pn.	1	23,5	28,5000	0,0884	0,0900	173,6	57,5	51	10,4	96	1,9688	6
	2	24	31,7258	0,0872	0,0920	173,68	57,6	51	10,55	96	1,9363	6
	3	24,5	33,1856	0,1122	0,1146	173,6	57,5	51	10,3	96	1,9375	6
	4	25	28,5599	0,0883	0,0917	173,7	57,6	51	10,5	95	1,9530	6
	5	24	28,9283	0,1049	0,1067	173,7	57,7	51	10,41	96	2	6
	6	24,5	27,7436	0,0764	0,0914	173,8	57,7	51	10,45	96	1,9813	6
	7	24	32,3216	0,0811	0,0857	173,4	57,5	51	10,4	96	2,0218	6
rata-rata		24,2143	30,1378	0,0912	0,0960	173,64	57,5857	51	10,4286	96	1,9712	6
Perlakuan-2 (P-2) 4 mg/0,1 ml ekstrak Pn.	1	24	27,3262	0,1082	0,1165	170,2	55,6	56	10,95	97	1,75	6
	2	25	31,8942	0,1003	0,1024	170,3	55,8	56	10,91	97	1,828	7
	3	25	28,6136	0,0830	0,0940	170,1	55,4	56	10,91	97	1,7793	7
	4	24,5	35,9139	0,0920	0,1130	169,9	55,6	56	10,91	97	1,7655	6
	5	25	25,8580	0,0987	0,0996	170,2	56	56	11	97	1,7683	6
	6	24	33,9087	0,0827	0,0930	170,1	55,9	56	11	97	1,7655	6
	7	25	29,7987	0,1085	0,1110	170,2	55,7	56	10,95	97	1,7968	6
rata-rata		24,6429	30,4733	0,0962	0,1042	170,1429	55,7143	56	10,9471	97	1,7791	6
Perlakuan-3 (P-3) 8 mg/0,1 ml ekstrak Pn.	1	24,5	28,2070	0,0985	0,1008	178	54,4	53	12,1	104	1,7030	8
	2	25	32,2647	0,1367	0,1418	177,9	54,2	53	12,15	104	1,7813	8
	3	25	28,5080	0,1142	0,1151	178	54,4	53	12,1	104	1,7030	8
	4	24	29,9668	0,1030	0,1127	178	54,5	53	12,1	104	1,7343	8
	5	24	29,9668	0,1007	0,1107	178,2	54,4	53	12,67	104	1,75	8
	6	24,5	26,8034	0,1040	0,1087	178	54,5	53	12,15	104	1,7188	8
	7	25	27,4941	0,1382	0,1515	170,8	54,6	53	12,07	104	1,6710	8
rata-rata		24,5714	29,2954	0,1136	0,1202	178,0143	54,4686	53	12,1057	104	1,7231	8

Lampiran 12 : Uji normalitas untuk sampel berat testis, diameter tub.sem., tebal epit.tub sem., jumlah sel spermatis primer terkoreksi, jumlah sel spermatid terkoreksi serta berat badan mencit awal dan akhir

Tests of Normality

DOSIS PHYLLANTHUS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic ^c	df	Sig.	Statistic ^c	df	Sig.
BERAT MENCIT AWAL	,00	7	,140	,893	7	,343
	2,00	7	,200*	,938	7	,588
	4,00	7	,192	,828	7	,071
	8,00	7	,174	,813	7	,065
BERAT MENCIT AKHIR	,00	7	,068	,883	7	,302
	2,00	7	,104	,856	7	,180
	4,00	7	,200*	,966	7	,849
	8,00	7	,200*	,944	7	,647

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

DOSIS PHYLLANTHUS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
BERAT TESTIS KIRI	,00	7	,200*	,906	7	,400
	2,00	7	,051	,900	7	,378
	4,00	7	,200*	,896	7	,357
	8,00	7	,093	,804	7	,051
BERAT TESTIS KANAN	,00	7	,074	,865	7	,081
	2,00	7	,059	,816	7	,069
	4,00	7	,200*	,901	7	,381
	8,00	7	,154	,845	7	,131

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

DOSIS PHYLLANTHUS	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DIAMETER TUB SEMINIFERUS	,00	7	,200*	,932	7	,535
	2,00	7	,141	,917	7	,452
	4,00	7	,125	,918	7	,421
	8,00	7	,195	,898	7	,368
TEBAL EPIT TUB SEM	,00	7	,200*	,951	7	,708
	2,00	7	,174	,813	7	,065
	4,00	7	,200*	,977	7	,936
	8,00	7	,141	,917	7	,452

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 13 : Hasil analisis varian satu arah berat testis kiri dan kanan**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
BERAT TESTIS KIRI	,00	7	9,19E-02	7,221E-03	2,73E-03	,083	,101
	2,00	7	9,09E-02	1,271E-02	4,80E-03	,076	,112
	4,00	7	9,59E-02	1,071E-02	4,05E-03	,082	,108
	8,00	7	,11343	1,685E-02	6,37E-03	,098	,138
	Total	28	9,80E-02	1,490E-02	2,82E-03	,076	,138
BERAT TESTIS KANAN	,00	7	,11571	3,159E-02	1,19E-02	,093	,186
	2,00	7	9,59E-02	1,014E-02	3,83E-03	,086	,114
	4,00	7	,10400	9,345E-03	3,53E-03	,093	,116
	8,00	7	,11957	1,886E-02	7,13E-03	,100	,151
	Total	28	,10879	2,085E-02	3,94E-03	,086	,186

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BERAT TESTIS KIRI	1,792	3	24	,176
BERAT TESTIS KANAN	1,474	3	24	,247

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BERAT TESTIS KIRI	Between Groups	2,320E-03	3	7,732E-04	5,051	,007
	Within Groups	3,674E-03	24	1,531E-04		
	Total	5,994E-03	27			
BERAT TESTIS KANAN	Between Groups	2,481E-03	3	8,269E-04	2,143	,121
	Within Groups	9,262E-03	24	3,859E-04		
	Total	1,174E-02	27			

Lampiran 14 : Hasil uji BNT berat testis kiri dan kanan

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) DOSIS PHYLLANTHUS	(J) DOSIS PHYLLANTHUS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
BERAT TESTIS KIRI	,00	2,00	1,0000E-03	6,61E-03	,881
		4,00	-4,000E-03	6,61E-03	,551
		8,00	-2,157E-02*	6,61E-03	,003
	2,00	,00	-1,000E-03	6,61E-03	,881
		4,00	-5,000E-03	6,61E-03	,457
		8,00	-2,257E-02*	6,61E-03	,002
	4,00	,00	4,0000E-03	6,61E-03	,551
		2,00	5,0000E-03	6,61E-03	,457
		8,00	-1,757E-02*	6,61E-03	,014
	8,00	,00	2,1571E-02*	6,61E-03	,003
		2,00	2,2571E-02*	6,61E-03	,002
		4,00	1,7571E-02*	6,61E-03	,014
BERAT TESTIS KANAN	,00	2,00	1,9857E-02	1,05E-02	,071
		4,00	1,1714E-02	1,05E-02	,276
		8,00	-3,857E-03	1,05E-02	,717
	2,00	,00	-1,986E-02	1,05E-02	,071
		4,00	-8,143E-03	1,05E-02	,446
		8,00	-2,371E-02*	1,05E-02	,033
	4,00	,00	-1,171E-02	1,05E-02	,276
		2,00	8,1429E-03	1,05E-02	,446
		8,00	-1,557E-02	1,05E-02	,151
	8,00	,00	3,8571E-03	1,05E-02	,717
		2,00	2,3714E-02*	1,05E-02	,033
		4,00	1,5571E-02	1,05E-02	,151

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 15 : Hasil analisis varian satu arah diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
DIAMETER	0	7	170,7714	,1496	5,654E-02	170,6	171,0
TUB	2	7	173,6286	,1254	4,738E-02	173,4	173,8
SEMINIFE	4	7	170,0143	,4525	,1710	169,0	170,3
RUS	8	7	178,0143	,1464	5,533E-02	177,8	178,2
	Total	28	173,1071	3,2042	,6055	169,0	178,2
TEBAL	0	7	48,2000	,1414	5,345E-02	48,00	48,40
EPIT TUB	2	7	57,5857	8,997E-02	3,401E-02	57,50	57,70
SEM	4	7	55,7143	,2035	7,693E-02	55,40	56,00
	8	7	54,4286	,1254	4,738E-02	54,20	54,60
	Total	28	53,9821	3,5893	,6783	48,00	57,70

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
DIAMETER TUB SEMINIFERUS	1,911	3	24	,155
TEBAL EPIT TUB SEM	1,576	3	24	,221

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DIAMETER	Between Groups	275,613	3	91,871	1390,479	,000
TUB	Within Groups	1,586	24	6,607E-02		
SEMINIFE	Total	277,199	27			
RUS	Between Groups	347,330	3	115,777	5433,089	,000
TEBAL	Within Groups	,511	24	2,131E-02		
EPIT TUB	Total	347,841	27			
SEM						

Lampiran 16 : Hasil uji BNT (beda nyata terkecil) diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) PERLA KUAN	(J) PERLA KUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
DIAMETER TUB SEMINIFERUS	0	2	-2,8571*	,1374	,000
		4	,7571*	,1374	,000
		8	-7,2429*	,1374	,000
	2	0	2,8571*	,1374	,000
		4	3,6143*	,1374	,000
		8	-4,3857*	,1374	,000
	4	0	-,7571*	,1374	,000
		2	-3,6143*	,1374	,000
		8	-8,0000*	,1374	,000
	8	0	7,2429*	,1374	,000
		2	4,3857*	,1374	,000
		4	8,0000*	,1374	,000
TEBAL EPIT TUB SEM	0	2	-9,3857*	7,803E-02	,000
		4	-7,5143*	7,803E-02	,000
		8	-6,2286*	7,803E-02	,000
	2	0	9,3857*	7,803E-02	,000
		4	1,8714*	7,803E-02	,000
		8	3,1571*	7,803E-02	,000
	4	0	7,5143*	7,803E-02	,000
		2	-1,8714*	7,803E-02	,000
		8	1,2857*	7,803E-02	,000
	8	0	6,2286*	7,803E-02	,000
		2	-3,1571*	7,803E-02	,000
		4	-1,2857*	7,803E-02	,000

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 17 : Hasil uji analisis regresi diameter dan tebal epitel tubulus seminiferus

Dependent variable : **diameter tubulus seminiferus**
 Method.. QUADRATI
 Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,84780
 R Square ,71877
 Adjusted R Square ,69627
 Standard Error 1,76587

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	199,24110	99,620552
Residuals	25	77,95747	3,118299

F = 31,94708 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	SigT
DOSPHYL	-,654058	,405923	-,614899	-1,611	,1197
DOSPHYL**2	,175244	,047061	1,421072	3,724	,0010
(Constant)	171,716234	,639550		268,496	,0000

Dependent variable : **TebaL epitel tubulus seminiferus**
 Method.. QUADRATI
 Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,87087
 R Square ,75841
 Adjusted R Square ,73908
 Standard Error 1,83341

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	263,80632	131,90316
Residuals	25	84,03475	3,36139

F = 39,24066 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	SigT
DOSPHYL	3,637273	,421449	3,052590	8,630	,0000
DOSPHYL**2	-,377922	,048861	-2,735781	-7,735	,0000
(Constant)	49,188052	,664010		74,077	,0000



Lampiran 18 : Hasil uji analisis varian satu arah jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
JUM SPERMATID KOREKSI	0	7	73,5515	,3341	,1263	73,03	73,97
JUM SPERMATID KOREKSI	2	7	102,8826	,6906	,2610	101,8	103,9
JUM SPERMATID KOREKSI	4	7	106,3079	,3800	,1436	105,6	106,7
JUM SPERMATID KOREKSI	8	7	93,2700	6,8107	2,5742	85,45	99,27
	Total	28	94,0030	13,3695	2,5266	73,03	106,7
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	0	7	16,6506	,1372	5,186E-02	16,55	16,95
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	2	7	24,8151	,1112	4,201E-02	24,68	25,00
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	4	7	25,9640	,1398	5,285E-02	25,78	26,25
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	8	7	18,5486	1,2524	,4733	17,11	19,55
	Total	28	21,4946	4,0903	,7730	16,55	26,25

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
JUM SPERMATID KOREKSI	175,254	3	24	,000
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	112,175	3	24	,000

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
JUM SPERMATID KOREKSI	Between Groups	4543,396	3	1514,465	128,565	,000
JUM SPERMATID KOREKSI	Within Groups	282,714	24	11,780		
JUM SPERMATID KOREKSI	Total	4826,109	27			
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	Between Groups	442,010	3	147,337	363,986	,000
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	Within Groups	9,715	24	,405		
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	Total	451,725	27			

Lampiran 19 : Hasil uji BNT (beda nyata terkecil) jumlah sel spermatosit primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) DOSIS PHYLLANTHUS	(J) DOSIS PHYLLANTHUS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
JUM SPERMATID KOREKSI	0	2	-29,3310*	1,8346	,000
		4	-32,7563*	1,8346	,000
		8	-19,7185*	1,8346	,000
	2	0	29,3310*	1,8346	,000
		4	-3,4253	1,8346	,074
		8	9,6125*	1,8346	,000
	4	0	32,7563*	1,8346	,000
		2	3,4253	1,8346	,074
		8	13,0378*	1,8346	,000
	8	0	19,7185*	1,8346	,000
		2	-9,6125*	1,8346	,000
		4	-13,0378*	1,8346	,000
JUM SPERMATOSIT KOREKSI	0	2	-8,1644*	,3401	,000
		4	-9,3134*	,3401	,000
		8	-1,8980*	,3401	,000
	2	0	8,1644*	,3401	,000
		4	-1,1490*	,3401	,002
		8	6,2665*	,3401	,000
	4	0	9,3134*	,3401	,000
		2	1,1490*	,3401	,002
		8	7,4154*	,3401	,000
	8	0	1,8980*	,3401	,000
		2	-6,2665*	,3401	,000
		4	-7,4154*	,3401	,000

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 20 : Hasil analisis regresi jumlah sel spermatis primer terkoreksi dan jumlah sel spermatid terkoreksi

Dependent variable : Jumlah sel spermatid terkoreksi

Method.. QUADRATI

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,94727
R Square ,89732
Adjusted R Square ,88911
Standard Error 4,45208

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	4330,5847	2165,2923
Residuals	25	495,5245	19,8210

F = 109,24245 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	SigT
DOSPHYL	14,964790	1,023405	3,371748	14,623	,0000
DOSPHYL**2	-1,595354	,118648	-3,100474	-13,446	,0000
(Constant)	75,128663	1,612419		46,594	,0000

Dependent variable:Jumlah sel spermatis primer terkoreksi

Method.. QUADRATI

Listwise Deletion of Missing Data

Multiple R ,98000
R Square ,96040
Adjusted R Square ,95723
Standard Error ,84589

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	433,83644	216,91822
Residuals	25	17,88822	,71553

F = 303,15790 Signif F = ,0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	SigT
DOSPHYL	4,625509	,194446	3,406479	23,788	,0000
DOSPHYL**2	-,554972	,022543	-3,525362	-24,618	,0000
(Constant)	16,959717	,306358		55,359	,0000

Lampiran 21: Hasil analisis varian satu arah berat badan mencit awal dan akhir

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
BERAT MENCIT AWAL	,00	7	24,4286	,5345	,2020	23,50	25,00
	2,00	7	24,2143	,4880	,1844	23,50	25,00
	4,00	7	24,6429	,4756	,1798	24,00	25,00
	8,00	7	24,5714	,4499	,1700	24,00	25,00
	Total	28	24,4643	,4893	9,247E-02	23,50	25,00
BERAT MENCIT AKHIR	,00	7	28,6571	2,1586	,8159	25,90	32,70
	2,00	7	30,1000	2,1878	,8269	27,70	33,10
	4,00	7	30,4286	3,6275	1,3711	25,80	35,90
	8,00	7	28,9857	1,8325	,6926	26,80	32,20
	Total	28	29,5429	2,5174	,4757	25,80	35,90

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BERAT MENCIT AWAL	,031	3	24	,992
BERAT MENCIT AKHIR	2,185	3	24	,116

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BERAT MENCIT AWAL	Between Groups	,750	3	,250	1,050	,389
	Within Groups	5,714	24	,238		
	Total	6,464	27			
BERAT MENCIT AKHIR	Between Groups	15,329	3	5,110	,787	,513
	Within Groups	155,780	24	6,491		
	Total	171,109	27			

Lampiran 22 : Uji korelasi antara berat badan mencit dengan variabel tergantung

Correlations

		BERAT MENCIT AWAL	BERAT MENCIT AKHIR	BERAT TESTIS KIRI	BERAT TESTIS KANAN	DIAM TUB SEM	TEBAL EPIT TUB SEM	JUM SPTID KORE KSI	JUM SPSIT KORE KSI
BERAT MENCIT AWAL	Pearson Correlation	1,000	-,018	,221	,210	-,005	-,051	,000	-,035
	Sig. (2-tailed)	,	,927	,258	,284	,982	,797	,999	,860
	N	28	28	28	28	28	28	28	23
BERAT MENCIT AKHIR	Pearson Correlation	-,018	1,000	-,095	-,005	-,139	,233	,210	,256
	Sig. (2-tailed)	,927	,	,631	,978	,480	,233	,283	,183
	N	28	28	28	28	28	28	28	23