

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN HESPERIDIN TERHADAP
SPERMATOGENESIS MENCIT (*Mus musculus*)
JANTAN**



Disusun oleh :

SANTI WULANDARI
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

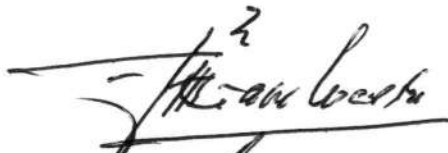
**PENGARUH PEMBERIAN HESPERIDIN TERHADAP
SPERMATOGENESIS MENCIT (*Mus Musculus*)
JANTAN**

**Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga**

Oleh :

SANTI WULANDARI
069412143

**Mengetahui,
Komisi Pembimbing**



I.G.K. Paridjata W., M.Agr.Sc., Drh
Pembimbing Pertama



Widjiati, M.Si., Drh
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh,
kami berpendapat bahwa diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh
gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN

Menguji
Panitia Penguji



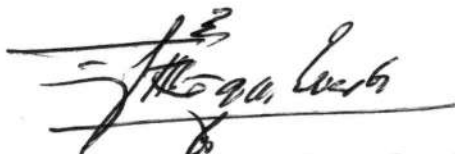
Drh. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si.
Ketua Penguji



Chairul Anwar, M.S., Drh.
Sekretaris



Indah Norma Triana, M.Si., Drh.
Anggota



I.G.K. Paridjata W., M.Agr.Sc., Drh.
Anggota



Widiati, M.Si., Drh.
Anggota

Surabaya, 9 Oktober 2000
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan




DR. Ismudiono, M.S. Drh.
NIP. 130687297

PENGARUH PEMBERIAN HESPERIDIN TERHADAP SPERMATOGENESIS MENCIT (*Mus Musculus*) JANTAN

Santi Wulandari

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh hesperidin yang merupakan senyawa glikosida flavonoid terhadap perkembangan testis dan spermatogenesis mencit (*Mus musculus*) jantan. Penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai salah satu alternatif bahan kontrasepsi pria.

Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit jantan strain BALB C umur 3 bulan berat badan (bb) 20-40 g. Mencit dipelihara dalam kandang berdasarkan kelompok perlakuan dan diberi pakan ayam Par-G dan minum dari PDAM secara *ad libitum*. Hesperidin diberikan per oral dengan sonde. Kelompok kontrol (P_0) diberi aquadest, kelompok perlakuan diberi hesperidin dosis 100 mg/kg bb (P_1), 200 mg/kg bb (P_2), dan 300 mg/kg bb (P_3). Pemberian dilakukan setiap hari selama 52 hari. Pada hari ke-54 dilakukan pembedahan mencit dan pembuatan sediaan histologi testis.

Disain penelitian ini memakai Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terbagi menjadi empat kelompok perlakuan, masing-masing terdiri sepuluh ekor mencit. Data dianalisis menggunakan sidik ragam (Analisis Varian) yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Hasil penelitian menunjukkan pemberian hesperidin dosis 100, 200 dan 300 mg/kg bb diameter tubulus seminiferus tidak berbeda nyata dibandingkan kontrol ($p < 0,05$). Dosis 100 mg/kg bb jumlah sel spermatogenik tidak berbeda nyata dibandingkan kontrol ($p < 0,05$), sedangkan dosis 200 dan 300 mg/kg bb jumlah sel spermatogenik berbeda nyata dibandingkan kontrol ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian hesperidin antara kelompok perlakuan tidak ada perbedaan diameter tubulus seminiferus dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$) tetapi jumlah sel spermatogeniknya lebih rendah dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$).

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi Allah atas kasih dan KebaihanNya penulis dapat menyelesaikan skripsi. Penulisan skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan tersusun tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak. Melalui kesempatan ini dengan segala hormat penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Bapak I.G.K. Paridjata Westra, M.Agr.Sc., Drh selaku pembimbing pertama dan Ibu Widjiati, M.Si., Drh selaku pembimbing kedua. Bapak Drs. Bambang Prajoga EW., MS., Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, atas fasilitas dan kesediaannya menjadi konsultan. Ibu, Mas Sugeng dan teman-temanku yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis sepenuhnya menyadari masih banyak terdapat kekurangan dan berharap adanya saran dan sumbangan pikiran dari para pembaca guna perbaikan tulisan ini. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan pihak-pihak yang memerlukan.

Surabaya, Oktober 2000

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Rumusan Masalah.....	3
I.3. Tujuan Penelitian.....	3
I.4. Manfaat Penelitian.....	3
I.5. Landasan Teori.....	4
I.6. Hipotesis.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
II.1. Tinjauan Tentang Flavonoid.....	6
II.2. Tinjauan Tentang Hesperidin.....	7
II.3. Reproduksi Hewan Jantan.....	8
II.3.1. Tinjauan Umum Tentang Testis.....	8

II.3.2. Pengaturan Fungsi Testis.....	10
II.3.3. Gambaran Testis Secara Histologis.....	11
II.3.4. Spermatogenesis.....	14
BAB III. MATERI DAN METODE.....	16
III.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
III.2. Materi Penelitian.....	16
III.2.1. Hewan Percobaan.....	16
III.2.2. Bahan Penelitian.....	16
III.2.3. Alat Penelitian.....	17
III.3. Metode Penelitian.....	17
III.3.1. Persiapan Hewan Percobaan.....	17
III.3.2. Perlakuan Hewan Percobaan.....	17
III.4. Peubah Yang Diamati.....	19
III.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	19
BAB IV. HASIL PENELITIAN.....	21
IV.1. Diameter Tubulus Seminiferus.....	21
IV.2. Jumlah Spermatogonium	22
IV.3. Jumlah Sel Spermatisit Primer dan Sekunder.	23

IV.4. Jumlah Sel Spermatid.....	24
IV.5. Jumlah Sel Spermatozoa.....	25
BAB V. PEMBAHASAN.....	26
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
RINGKASAN.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	35
GAMBAR.....	39
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Rataan Diameter Tubulus Seminiferus dari Testis Mencit (<i>Mus musculus</i>) Setelah Pemberian Hesperidin.....	21
2.	Rataan Jumlah Sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus. Testis Mencit (<i>Mus musculus</i>) Setelah Pemberian Hesperidin.....	22
3.	Rataan Jumlah Sel Spermatisit dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (<i>Mus musculus</i>) Setelah Pemberian Hesperidin.....	23
4.	Rataan Jumlah Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (<i>Mus musculus</i>) Setelah Pemberian Hesperidin.....	24
5.	Rataan Jumlah Sel Spermatozoa dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (<i>Mus musculus</i>) Setelah Pemberian Hesperidin.....	25

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Rumus Bangun Hesperidin.....	8
2.	Potongan Membujur Testis.....	10
3.	Histologi Testis Pada Kelompok Kontrol (P ₀).....	40
4.	Histologi Testis Setelah Pemberian Hesperidin Dosis 100 mg/kg bb (P ₁).....	40
5.	Histologi Testis Setelah Pemberian Hesperidin Dosis 200 mg/kg bb (P ₂).....	41
6.	Histologi Testis Setelah Pemberian Hesperidin Dosis 300 mg/kg bb (P ₃).....	41
7.	Perlakuan Pada Saat Pemberian Hesperidin Per Oral Pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) jantan.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Evaluasi Statistik Diameter Tubulus Seminiferus dalam mikrometer dengan Mikroskop Pembesaran 100x.....	44
2.	Evaluasi Statistik Jumlah sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin	46
3.	Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatisid Primer dan Spermatisid Sekunder dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin	49
4.	Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin.....	52
5.	Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatozoa dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin.....	55
6.	Pembuatan Sediaan Histologi Testis.....	58

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Perkembangan metode kontrasepsi untuk pria jauh ketinggalan dibandingkan dengan kontrasepsi untuk wanita. Sampai saat ini penelitian penggunaan kontrasepsi pria terus diupayakan untuk menghasilkan suatu metode kontrasepsi yang ideal dalam arti berdaya guna, aman, murah, mudah didapat, mempunyai efek samping minimal, bersifat reversibel dan tidak memerlukan motivasi yang terus-menerus (Rois, 2000).

Selama ini metode kontrasepsi terbatas pada metode sterilisasi dan pemberian obat-obatan yang bersifat hormonal. Pemberian obat-obatan yang bersifat hormonal biasanya mempunyai efek samping yang merugikan. Oleh karena itu perlu mengembangkan kontrasepsi lain sebagai alternatif penggunaan kontrasepsi yang sudah ada.

Salah satu pengembangan kontrasepsi pria adalah dengan mencari bahan yang berfungsi mengganggu aktivitas enzim yang berperan pada proses fertilisasi. Enzim tersebut antara lain: hialuronidase, CPE (Corona Penetrating Enzyme) dan akrosin (Widjiati, 1997).

Menurut Prajogo *dkk.* (1997) masing-masing enzim mempunyai peranan yang penting dalam fertilisasi. Hialuronidase berfungsi untuk membuka matrik kumulus ooporus dengan jalan melarutkan asam hialuronik, enzim penetrasi corona berperan dalam penetrasi spermatozoa

pada lapisan korona radiata sedangkan akrosin berperan menembus zona pelucida. Apabila enzim hialuronidase dihambat, maka spermatozoa tidak dapat melaksanakan fungsinya untuk membuka matrik kumulus ooporus, sehingga tidak terjadi fertilisasi. Hambatan ini juga berpengaruh terhadap enzim lain pada akrosom yang berperan pada proses fertilisasi (Li *et al.*, 1997).

Menurut Fransworth dan Walter (1982) terdapat beberapa bahan aktif yang menghambat enzim hialuronidase spermatozoa yang diperlukan dalam fertilisasi dan salah satunya adalah glikosida flavonoid.

Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan inhibitor enzim hialuronidase. Pada tahun 1948 sampai dengan tahun 1954 banyak dilaporkan tentang aktivitas hesperidin per oral dan intraperitoneal dapat mencegah terjadinya fertilisasi baik pada hewan maupun manusia. Namun setelah itu tidak diketahui kelanjutan penelitian tersebut, oleh karena itu perlu dikaji kembali tentang kemungkinan hesperidin dipakai sebagai bahan kontrasepsi pria (Zaneveld, 1976).

Sebelum digunakan sebagai antifertilitas, hesperidin perlu dilakukan uji biologis dalam berbagai aspek, salah satunya melalui mengamatan terhadap proses spermatogenesis.

I.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat diambil beberapa permasalahan yang dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian hesperidin per oral terhadap perkembangan tubulus seminiferus testis mencit (*Mus musculus*)?
2. Bagaimana pengaruh pemberian hesperidin per oral terhadap spermatogenesis mencit (*Mus musculus*)?

I.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh hesperidin per oral terhadap perkembangan tubulus seminiferus testis mencit (*Mus musculus*).
2. Mengetahui pengaruh hesperidin per oral terhadap spermatogenesis mencit (*Mus musculus*).

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai :

1. Bahan penunjang tentang pengembangan obat yang berkaitan dengan anti fertilitas pada pria atau pejantan.
2. Salah satu alternatif bahan kontrasepsi pria.

I.5. Landasan Teori

Pada tahun 1948 sampai dengan tahun 1954 banyak dilaporkan tentang aktivitas hesperidin, pada pemberian per oral dan intraperitoneal dapat mencegah terjadinya fertilisasi baik pada hewan maupun manusia. Melalui uji klinik diketahui pula bahwa pemberian hesperidin pada pria dan wanita tidak memberikan efek samping dan bersifat reversibel (Zaneveld, 1976).

Selanjutnya dilaporkan hesperidin menghambat penetrasi spermatozoa mencit dalam proses fertilisasi *in vitro*, yang mengakibatkan tidak terjadinya fertilisasi pada setiap kelompok perlakuan (Widjiati dkk., 1997). Widjiati juga mengungkapkan bahwa pemberian hesperidin pada mencit (*Mus musculus*) ternyata menurunkan aktivitas enzim hialuronidase.

Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan inhibitor enzim hialuronidase (Prajogo dkk., 1997). Sejauh ini belum diketahui apakah pemakaian hesperidin selain menghambat aktivitas enzim hialuronidase juga berpengaruh negatif terhadap proses spermatogenesis. Menurut Markham (1985) senyawa flavonoid bersifat sitotoksik. Sifat sitotoksik inilah yang mempunyai efek spermasidal.

I.6. Hipotesis

Hipotesis yang dapat diajukan adalah :

1. Pemberian hesperidin per oral dapat menghambat perkembangan tubulus seminiferus testis mencit (*Mus musculus*).
2. Pemberian hesperidin per oral dapat menghambat spermatogenesis mencit (*Mus musculus*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Tinjauan Tentang Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini adalah zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Trease and Evans, 1985).

Senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan sistem 1,3-Diarilpropan. Dalam hal ini flavon mempunyai tingkat oksidasi terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tata nama senyawa-senyawa turunan flavon. Dari berbagai jenis flavonoid tersebut flavon, flavonol dan antosianin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam sehingga sering disebut sebagai flavonoid utama, sedangkan yang lain jumlahnya terbatas. Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan karena variasi struktur tetapi lebih disebabkan berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi dari struktur tersebut (Griffit, 1982).

Beberapa jenis flavonoid yang berkhasiat sebagai antifertilitas pria antara lain: kirantin, dehidrokversetin, eriodiktilol, naringenin, hesperidin, rutin, xantorhamnol, kuersetin, ramnetin, tektorigenin (Farnsworth and Walter, 1982).

II.2. TINJAUAN PUSTAKA HESPERIDIN

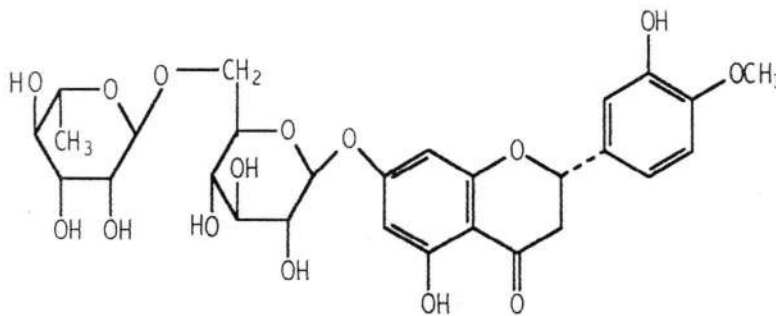
Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan merupakan senyawa polifenol yang termasuk bahan-bahan inhibitor enzim hyaluronidase (Widjiati, 1997).

Menurut Gyorgyi dan Szent (2000) hesperidin adalah suatu bioflavonoid yang merupakan bagian dari suatu kelompok zat berwarna yang ditemukan di banyak buah-buahan seperti citrin dan kulit buah jeruk. Hesperidin penting bagi penyerapan dan pengolahan vitamin C. Bioflavonoid kadang-kadang disebut vitamin P yang ditemukan sebagai komponen penting dalam menyembuhkan memar dan meningkatkan kemampuan serap dan integritas saluran kapiler. Hesperidin suplemen juga bisa membantu mereduksi odema atau bengkak besar di kaki akibat akumulasi cairan. Seperti bioflavonoid lain hesperidin bekerja dengan baik bila diberikan dengan vitamin C dan bioflavonoid lain.

Di dalam tubuh hesperidin mengalami metabolisme menjadi hesperitin, ini dibuktikan dengan ditemukannya hesperitin pada urin manusia setelah mengkonsumsi buah citrus yang mengandung hesperidin (Ameer *et al.*, 1996 and Rouseff *et al.*, 1987).

Pemberian hesperidin secara normal terbukti tidak menimbulkan toksisitas, hal ini telah dijelaskan oleh Kawabe *et al.* (1993) bahwa pemberian methyl hesperidin pada mencit jantan maupun betina hingga tingkat 5% dalam pakan tidak ditemukan adanya toksisitas pada sebagian besar organ

Pada tahun 1948 sampai tahun 1954 banyak laporan tentang aktivitas hesperidin, pada pemberian per oral dan intraperitonial dapat mencegah terjadinya fertilitas baik pada hewan maupun manusia. Namun setelah itu tidak diketahui kelanjutan dari penelitian tersebut (Zaneveld, 1976).



Gambar 1. Rumus bangun hesperidin (Sumber : Anonimus, 1989)

II.3. Reproduksi Hewan Jantan

II.3.1. Tinjauan Umum Tentang Testis

Sistem reproduksi hewan jantan terdiri dari sepasang testis (organ kelamin primer yang mereduksi sperma), kelenjar pelengkap (asesoris), saluran transport sperma (epididimis, duktus deferens dan uretra) serta alat kelamin luar berupa penis sebagai alat kopulasi dan skrotum (Hafez, 1993).

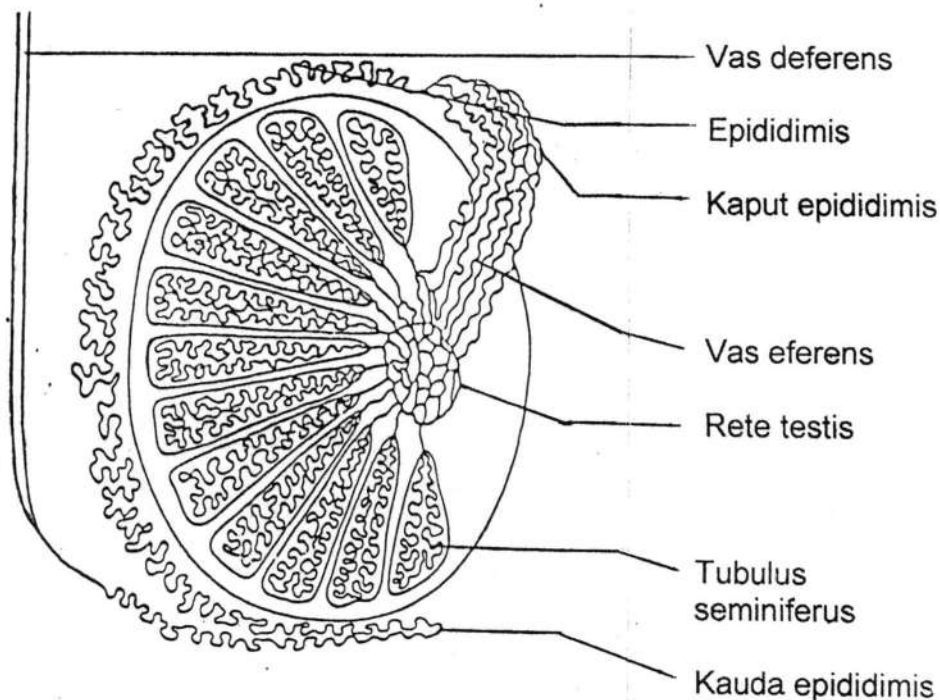
Kelenjar pelengkap (asesoris) sistem reproduksi hewan jantan terdiri dari kelenjar bulbouretralis, kelenjar vesikula seminalis dan kelenjar prostat. Kelenjar asesoris tersebut merupakan bagian terbesar dari

semen dan mengandung karbohidrat, protein, asam amino, enzim, vitamin larut air, mineral, asam sitrat dan bahan organik lain. Cairan asesoris ini berfungsi sebagai bufer terhadap sifat keasaman yang berlebih pada saluran genital betina dan mempunyai kandungan mineral yang seimbang (medium yang cocok untuk makanan) sehingga sel spermatozoa dalam semen mempunyai daya hidup lama (Frandsen, 1992).

Testis berkembang dalam rongga abdomen dan dalam keadaan normal bermigrasi ke skrotum selama perkembangan fetus (Ganong, 1990). Menurut Frandsen (1992) testis bervariasi pada tiap spesies dalam hal bentuk, ukuran dan lokasi, tetapi struktur utamanya sama. Temperatur skrotum $\pm 7^\circ$ F lebih rendah, dibanding temperatur normal tubuh dan merupakan lingkungan yang sesuai untuk fungsi spermatogenik testis. Pada golongan rodensia testis dengan mudah berpindah-pindah dari dalam kantong skrotum ke dalam rongga perut tergantung kondisi lingkungan. Pada musim kawin testis golongan rodensia berada di dalam kantong skrotum sedangkan di luar musim kawin berada di dalam rongga perut (Hafez, 1993; Ismudiono 1996).

Testis terbungkus dalam kantong skrotum yang berfungsi melindungi testis dari gangguan luar berupa pukulan, panas, dingin dan gangguan mekanis lainnya. Fungsi terpenting adalah mempertahankan suhu testis sampai beberapa derajat dibawah suhu tubuh sehingga memungkinkan spermatogenesis berlangsung secara sempurna. Pada

suhu luar skrotum dapat melindungi testis dengan jalan mengkerut atau mengendorkan dinding skrotum (Ganong, 1990; Hardjopranjoto, 1995).



Gambar 2. Potongan Membujur Testis (Bearden and Fuquay, 1992).

II.3.2. Pengaturan Fungsi Testis

Ditinjau dari fungsinya testis mempunyai dua fungsi penting yaitu reproduktif dan endokrinologis. Fungsi reproduktif menghasilkan sel spermatozoa yang dibentuk melalui spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus. Sedangkan endokrinologis testis yaitu menghasilkan berbagai hormon steroid (androgen/testosteron dan estrogen) dan hormon non steroid (inhibin). Perkembangan dan fungsi testis dipelihara oleh hormon gonadotropin (*Follicle Stimulating Hormone/FSH* dan *Luteinizing*

Hormone/LH atau disebut *Interstitial Cell Stimulating Hormone/ICSH*) yang dihasilkan oleh hipofisa anterior. Sintesis dan sekresi hormon gonadotropin dari kelenjar hipofisa anterior ini distimulir oleh *Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH)* yang disekresikan dari hipotalamus (Frandsen, 1992; Hardjopranto, 1995).

FSH bekerja di dalam tubulus seminiferus untuk merangsang proses spermatogenesis dan sel sertoli untuk menghasilkan inhibin serta berperan dalam proses aromatisasi testosteron menjadi estrogen. LH bekerja pada sel interstitial/leydig untuk menghasilkan testosteron. Testosteron, estrogen dan inhibin secara bersama-sama menghambat sekresi FSH, sedangkan sekresi LH dihambat secara bersama-sama oleh testosteron dan estrogen.

Poros hipotalamus-hipofisa-testis merupakan kontrol hormonal, yang artinya hipotalamus menstimulir hipofisa anterior untuk mensekresikan hormon gonadotropin dengan target testis. Selanjutnya terdapat mekanisme feedback yang menghambat hipotalamus oleh hormon yang dihasilkan testis (Tomaszwska *dkk.*, 1991; Poernomo *dkk.*, 1999).

II.3.3. Gambaran Testis Secara Histologis

Pada potongan melintang testis tampak bentukan tubulus seminiferus yang banyak sekali. Dinding tubulus seminiferus terdiri dari tiga lapisan, dari luar ke dalam adalah tunika propria, lamina basalis dan

lapisan epithelium. Tunika propria terdiri dari jaringan fibroelastis dan berfungsi sebagai alat transpor sel spermatozoa dari tubulus seminiferus ke epididimis dengan jalan kontraksi sehingga sel spermatozoa dapat bergerak keluar. Pada epithelium terdiri dari dua jenis sel yaitu sel sertoli (penyokong) yang fungsinya memberi makan pada sel kelamin dan sel germinatif yang akan mengalami perubahan selama proses spermatogenesis dengan tingkat-tingkat: spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa (Gilbert, 1988; Ismudiono, 1996).

Sel germinal atau sel spermatogenik menyusun suatu lapisan epithelium berlapis pipih, empat sampai delapan lapis sel, yang meliputi bagian dalam tubulus seminiferus. Sel ini mengalami perubahan progresif mulai dari daerah dasar tubulus seminiferus mengarah ke pusat lumen. Akibat jumlah yang meningkat maka sel ini didesak ke arah lumen (Frandsen, 1992).

Sel sertoli mempunyai bentukan yang panjang dan kadang-kadang seperti piramid, terletak dekat atau di antara sel-sel germinal. Sel sertoli juga bersifat fagosit, karena memakan sel-sel spermatogenik yang mati atau mengalami degenerasi. Ada sel lain yang berperan pula dalam spermatogenesis yaitu sel Leydig yang terdapat di luar tubulus seminiferus (Hardjopranjoto, 1995; Hafez, 1993).

Sel spermatogenik terdiri dari: spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa dengan morfologi sebagai berikut:

- a. Sel spermatogonium ada dua tipe yaitu spermatogonium tipe A dan spermatogonium tipe B yang terletak dekat membrana basalis. Inti sel spermatogonium tipe A adalah lonjong, berwarna gelap atau pucat, sedangkan sel spermatogonium tipe B mempunyai inti bulat, butir-butir kromatin padat yang berhubungan dengan membran inti (Leeson dan Leeson 1994).
- b. Spermatosit primer merupakan sel benih terbesar, letaknya agak ke tengah lumen tubulus seminiferus dibanding spermatogonium. Selnya berbentuk bulat atau bulat telur dan inti selnya biasanya ada dalam salah satu tingkat profase, terlihat besar dan jelas pada tengah sel (Leeson dan Leeson, 1994; Poernomo *dkk.*, 1999). Spermatosit sekunder bentuk selnya lebih kecil dibanding spermatosit primer, inti berbentuk bulat, biasanya sukar ditemukan dalam potongan testis karena dalam tahap interfase yang sangat singkat dan cepat. Jumlah kromosom hanya setengah dari jumlah kromosom spermatosit primer (Frandsen, 1992; Jungueira dan Carneiro, 1994).
- c. Spermatid mempunyai ukuran yang kecil, inti bulat dengan daerah kromatin yang padat, letak dekat bagian tengah tubulus seminiferus (Hafez, 1993; Poernomo *dkk.*, 1999). Inti spermatid berada di bagian anterior sel, benda-benda golgi berkumpul di kutub inti bagian anterior

lalu memipih dan membentuk mantel dibagian kutub. Vakuola-vakuola antara mantel dan kutub inilah yang akhirnya membentuk akrosom (Salisbury dan Demark, 1985; Geneser, 1992).

- d. Spermatozoa memiliki dua bagian utama yakni kepala dan ekor, dengan mikroskop elektron bagian ekor dapat dibagi atas leher, badan, ekor utama dan ujung ekor (Dellmann dan Brown, 1992). Sel ini mempunyai kepala yang mengandung inti memadat dan tudung kepala. Di dalam intinya mengandung kromosom dimana dalam tiap-tiap kromosom mengandung gen-gen yang membawa sifat (Bloom dan Fawcett, 1992).

II.3.4. Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah suatu proses pembentukan spermatozoa yang terdapat di dalam tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis terdiri dari dua fase yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis adalah pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonia tipe B melalui proses pembelahan mitosis yang dilanjutkan dengan pembelahan meiosis menjadi spermatid. Spermiogenesis adalah proses metamorfosis seluler dari spermatid menjadi spermatozoa yang sempurna. Selama perkembangannya menjadi spermatozoa spermatogonia mendapatkan makanan dari sel sertoli (Berdan dan Fuguay, 1992).

Spermatogenesis dimulai dari sel epitel germinatif yang terletak dekat membrana basalis. Terdapat dua macam sel spermatogonium yaitu: tipe A, yang mengalami pembelahan mitosis menjadi dua sel yaitu spermatogonium tipe A dan spermatogonium tipe B. Spermatogonium tipe B aktif membagi diri secara mitosis membentuk sel spermatosit primer. Sel spermatosit primer akan mengalami pembelahan secara meiosis menjadi sel spermatosit sekunder. Sel spermatosit sekunder dengan cepat akan mengalami pembelahan mitosis menjadi sel spermatid. Dengan dibentuknya spermatid, maka berakhirilah spermatogenesis (Hafez, 1993).

Menurut Poernomo *dkk.* (1999) spermiogenesis ditandai dengan spermatid yang mengalami metamorfosis dan berubah bentuknya menghasilkan spermatozoa yang sempurna. Pada proses ini tidak terjadi pembelahan sel tetapi suatu proses dari transformasi sel yaitu aparat golgi menjadi tudung anterior atau akrosom, inti spermatid menjadi kepala sperma, dari sentriol keluar flagela (ekor), plasma membran menjadi selubung tubuh sperma dan mitokondria mengumpul di bagian ekor.

Siklus spermatogenesis pada tikus dan mencit dimulai saat pubertas bersamaan dengan penurunan testis ke dalam skrotum. Waktu dan siklus spermatogenesis adalah konstan. Pada mencit proses mitosis membutuhkan waktu 8 hari, sedangkan proses meiosis berlangsung membutuhkan selama 13,5 hari. Jadi siklus spermatogenesis secara lengkap pada mencit berlangsung selama 34,5 hari (Wittingham dan Wood, 1992).

BAB III

MATERI DAN METODE

III.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Farmasi. Pembuatan dan pemeriksaan preparat histologi di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Waktu penelitian dilakukan pada tanggal 13 Oktober 1999 sampai dengan 5 Februari 2000.

III.2. Materi Penelitian

III.2.1. Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jantan strain BALB-C yang sudah diuji fertilitasnya, berumur dua-tiga bulan dengan berat badan rata-rata 20 – 40 gram. Mencit tersebut diperoleh dari Pusvetma.

III.2.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan ialah : Hesperidin bentuk serbuk (Fluka), aquadest, pakan ayam jenis Par-G, air minum, alkohol, Canada balsem, formalin 10 %, paraffin, zat warna Hematoxylin Eosin, dan xilol.

III.2.3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: timbangan elektronik Sartorius 2402, mikroskop, mikrometer okuler dan kamera. Kandang mencit yang terbuat dari plastik polypropilen, tempat makan dari plastik, tempat minum dari botol dengan tutup pipa, spuit yang dimodifikasi dengan ujung tumpul, tabung erlenmeyer, pinset, gunting anatomi, pot plastik

I.3. Metode Penelitian

III.3.1. Persiapan Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan 40 ekor mencit jantan yang dibagi secara acak dalam empat kelompok perlakuan yang terdiri atas sepuluh ulangan. Semua mencit dimasukkan dalam kandang yang dilengkapi tempat pakan dan minum. Mencit-mencit tersebut diadaptasikan selama satu minggu. Semua mencit mendapat perawatan yang sama selama perlakuan dan setiap minggu dilakukan penimbangan berat badan untuk penentuan dosis perlakuan.

III.3.2. Perlakuan Hewan Percobaan

Empat puluh ekor mencit dibagi secara acak menjadi empat kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri 10 ekor mencit. Empat perlakuan itu adalah :

Kelompok P_0 : diberikan 0,5 ml aquadest sebagai kelompok kontrol.

- Kelompok P₁ : diberikan hesperidin 100 mg/kg bb setiap hari selama 52 hari.
- Kelompok P₂ : diberikan hesperidin 200 mg/kg bb setiap hari selama 52 hari.
- Kelompok P₃ : diberikan hesperidin 300 mg/kg bb setiap hari selama 52 hari.

Dosis hesperidin diberikan pada mencit berdasarkan dosis yang diberikan pada manusia (Zaneveld, 1976).

Pemberian hesperidin per oral dilaksanakan setiap hari selama 52 hari (1,5 siklus spermatogenesis). Cara pemberian dengan menggunakan syringe disposable tuberculine satu milimeter yang dilengkapi jarum khusus yang ujungnya tumpul (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Pada hari ke 54 mencit dari semua kelompok perlakuan dibunuh dengan cara pembiusan yaitu hewan percobaan dimasukkan ke dalam toples kaca yang berisi kloroform. Setelah mati dilakukan pembedahan untuk mengambil testis. Masing-masing testis dimasukkan ke dalam pot obat yang berisi formalin 10% untuk dibuat preparat histologi.

1.4. Peubah Yang Diamati

Pengamatan dilakukan terhadap histologi testis yang meliputi: diameter tubulus seminiferus, jumlah sel spermatogonia, sel spermatosit, sel spermatid, dan sel spermatozoa.

Pengukuran diameter tubulus seminiferus dengan menggunakan mikrometer okuler yang telah distandarisasikan, dengan skala satu strip sebanding 13,89 mikrometer. Diameter tubulus seminiferus diukur pada diameter terpendek.

Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop dengan menggunakan pembesaran 100x kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 400x. Cara perilaiannya dengan melakukan penghitungan pada tiga potongan testis yang berbeda untuk setiap ulangan pada masing-masing perlakuan. Tiap potongan dilakukan pengamatan pada dua tubulus seminiferus yang besarnya kurang lebih sama. Hasilnya diambil rata-rata dari jumlah masing-masing perhitungan. Perhitungan ini merupakan modifikasi dari prosedur yang digunakan oleh Tedja (1993).

III.5. Rancangan Penelitian Dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil penelitian tersebut dianalisis dengan menggunakan sidik ragam. Kriteria uji dengan sidik ragam sebagai berikut:

Bila F hitung $>$ F tabel 5%, berarti ada perbedaan yang nyata di antara perlakuan.

Bila F hitung $<$ F tabel 5%, berarti tidak ada perbedaan yang nyata di antara perlakuan.

Apabila terdapat perbedaan yang nyata dalam pengujian sidik ragam akan dilanjutkan ke Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% untuk membandingkan antar perlakuan tersebut (Kusriningrum, 1989).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian tentang gambaran histologi testis mencit setelah pemberian hesperidin dosis 100 mg/kg bb (P_1), 200 mg/kg bb (P_2) dan 300 mg/kg bb (P_3) diperoleh hasil sebagai berikut:

IV.1. Diameter Tubulus Seminiferus

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Rataan diameter tubulus seminiferus tiap kelompok dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rataan Diameter Tubulus Seminiferus dari Testis Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Hesperidin.

Perlakuan	Diameter Tubulus Seminiferus ($X \pm SD$) (Mikrometer)
P_0	130,568 \pm 4,7846 ^a
P_1	129,226 \pm 4,9115 ^a
P_2	132,884 \pm 5,2568 ^a
P_3	129,874 \pm 5,8213 ^a

keterangan: superskrip huruf yang sama pada kolom diatas menunjukkan tidak adanya perbedaan

Hasil analisis statistik dengan sidik ragam, ternyata dari keempat perlakuan tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap diameter tubulus seminiferus.

IV.2. Jumlah Spermatogonium

Hasil penelitian menunjukkan pemberian hesperidin menurunkan jumlah sel spermatogonium ($p < 0,05$). (Tabel 2).

Tabel 2. Rataan Jumlah Sel Spermatogonia Rataan dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Hesperidin.

Perlakuan	Jumlah Sel Spermatogonia ($X \pm SD$)
P ₀	35,18 ± 1,8642 ^a
P ₁	34,43 ± 2,1370 ^{ab}
P ₂	32,98 ± 1,7415 ^{bc}
P ₃	31,37 ± 2,1339 ^c

keterangan: superskrip a, b, dan c yang berbeda pada kolom diatas menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan uji BNT 5%, kelompok kontrol (P₀) menunjukkan jumlah spermatogonia yang terbanyak, meskipun tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok perlakuan satu (P₁). Jumlah sel spermatogonium paling sedikit diperoleh pada kelompok perlakuan tiga (P₃) yang tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan dua (P₂). Kelompok perlakuan dua (P₂) tidak berbeda nyata dengan P₁ ($p < 0,05$).

IV.3. Jumlah Sel Spermatisit Primer dan Sekunder

Hasil penelitian menunjukkan penurunan jumlah sel spermatisit primer dan sekunder bila dibandingkan dengan kontrol (Tabel 3)

Tabel 3. Rataan Jumlah Sel Spermatisit dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Hesperidin.

Perlakuan	Jumlah Sel Spermatisit ($X \pm SD$)
P ₀	46,11 ± 2,8900 ^a
P ₁	44,24 ± 2,6349 ^b
P ₂	43,17 ± 2,1751 ^b
P ₃	42,07 ± 2,4904 ^b

Keterangan: superskrip yang berbeda pada kolom diatas menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan uji BNT 5% kelompok kontrol (P₀) mempunyai jumlah sel spermatisit terbanyak dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain ($p < 0,05$). Perlakuan tiga (P₃) mempunyai jumlah sel spermatisit paling sedikit yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan dua (P₂) dan satu (P₁).

IV.4. Jumlah Sel Spermatisit

Hasil penelitian menunjukkan pemberian hesperidin menurunkan jumlah sel spermatisit ($p < 0,05$). (Tabel 4).

Tabel 4. Rataan Jumlah Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Hesperidin.

Perlakuan	Jumlah Sel Spermatid ($\bar{X} \pm SD$)
P ₀	42,54 ± 2,3319 ^a
P ₁	39,71 ± 3,3084 ^{ab}
P ₂	38,68 ± 2,0574 ^{bc}
P ₃	36,37 ± 2,3730 ^c

Keterangan: superkrip a, b, dan c yang berbeda pada kolom diatas menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan uji BNT 5% kelompok kontrol (P₀) mempunyai jumlah sel spermatid terbanyak dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Perlakuan dua (P₂) tidak berbeda nyata dengan P₁ ($p < 0,05$). Sedangkan perlakuan tiga (P₃) mempunyai jumlah spermatid paling sedikit dan tidak berbeda dengan P₂ ($p < 0,05$).

IV.5. Jumlah Sel Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan pemberian hesperidin menurunkan jumlah sel spermatozoa ($p < 0,05$). (Tabel 5).

Tabel 5. Rataan Jumlah Sel Spermatozoa dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit (*Mus musculus*) Setelah Pemberian Hesperidin.

Perlakuan	Jumlah Sel Spermatozoa ($\bar{X} \pm SD$)
P ₀	42,33 ± 2,3017 ^a
P ₁	40,78 ± 2,3289 ^{ab}
P ₂	39,09 ± 1,6543 ^{bc}
P ₃	37,95 ± 1,4931 ^c

keterangan: superkrip a, b, dan c yang berbeda pada kolom diatas menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Setelah dilakukan uji BNT 5% kelompok kontrol (P₀) mempunyai jumlah sel spermatozoa terbanyak dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan satu (P₁). Perlakuan tiga (P₃) mempunyai jumlah spermatozoa paling sedikit yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan dua (P₂). Perlakuan dua (P₂) tidak berbeda nyata dengan P₁ ($p < 0,05$).

BAB V

PEMBAHASAN

Pemberian hesperidin per oral dengan dosis 100 mg/kg bb, 200 mg/kg bb, dan 300 mg/kg bb mengakibatkan penurunan jumlah sel-sel kelamin pada testis mencit secara nyata ($p < 0,05$).

Penurunan jumlah sel spermatogonia tidak diikuti oleh perubahan diameter tubulus seminiferus. Hal ini dapat diketahui dari hasil penelitian yang menunjukkan pemberian hesperidin pada P₀, P₁, P₂, dan P₃ tidak ada perbedaan diameter tubulus seminiferus bila dibandingkan dengan kontrol. Menurut Frandson (1992) dan Hardjopranjoto (1995) perkembangan dan fungsi testis dipelihara oleh hormon gonadotropin yaitu FSH dan LH/ICSH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior. Jadi perkembangan tubulus seminiferus mencit dengan peubah diameter tubulus seminiferus yang tetap normal menunjukkan kontrol hormonal pada testis tetap berjalan normal.

Hasil penelitian ini ternyata didukung oleh Rois (2000) yang mempergunakan ekstrak daun *Gendarussa vulgaris Nees* dan menghasilkan tidak adanya perubahan diameter tubulus seminiferus. Selanjutnya Rois juga menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun *Gendarussa vulgaris Nees* ini bersifat reversibel, sehingga ada kemungkinan pemberian hesperidin juga bersifat reversibel yang artinya

apabila pemberian hesperidin dihentikan dapat memulihkan kembali fertilitas pejantan.

Dari hasil penelitian menunjukkan jumlah sel spermatogonium pada P₂ dosis 200 mg/kg bb dan P₃ dosis 300 mg/kg bb berbeda nyata dibandingkan kontrol, sedangkan P₁ dosis 100 mg/kg bb tidak berbeda nyata dibandingkan kontrol. Perlakuan satu (P₁) menunjukkan dosis tersebut masih dapat ditolerir oleh sel spermatogonium karena FSH dan LH tidak terhambat oleh pemberian hesperidin dosis 100 mg/kg bb. Sesuai dengan pernyataan Poernomo *dkk.* (1999) FSH menstimulir pertumbuhan sel germinatif dari tubulus seminiferus dan mendorong terjadinya proses spermatogenesis secara sempurna. Pemberian hesperidin dosis 200 mg/kg bb (P₂) sudah mampu menekan sel-sel spermatogonium, sehingga mengalami degenerasi karena sifat sitotoksik hesperidin sebagai salah satu glikosida flavonoid.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan pemberian hesperidin pada kelompok P₁, P₂ dan P₃ menyebabkan penurunan yang tidak berarti terhadap jumlah rata-rata sel spermatisit primer dan spermatisit sekunder. Perlakuan satu (P₁), P₂ dan P₃ berbeda nyata dibandingkan kontrol. Seiring dengan meningkatnya dosis yang diberikan, semakin besar dosisnya makin menurun pula jumlah sel spermatisit yang dihasilkan. Jumlah sel spermatisit paling sedikit terdapat pada perlakuan tiga. Kemungkinan hesperidin dosis 300 mg/kg bb ini menyebabkan absorpsi yang terus menerus pada sel spermatogenik sehingga

menimbulkan gangguan pada proses spermatogenesis. Ada juga kemungkinan media atau lingkungan sekitar testis yang kurang begitu menguntungkan. Pengamatan sitologik menunjukkan bahwa secara normal sel-sel germinal harus mengalami diferensiasi terus menerus. Apabila lingkungan tidak memungkinkan untuk berdiferensiasi pada laju normalnya maka sel-sel akan mengalami degenerasi dan dibuang dari sistem (Turner dan Bagnara, 1988).

Hasil penelitian jumlah sel spermatid menunjukkan P_2 dan P_3 berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$). Perlakuan satu (P_1) tidak berbeda nyata dengan kontrol. Jumlah spermatid paling sedikit terdapat pada P_3 . Hal ini sesuai dengan tahap awal dari fase spermatositogenesis yaitu mulainya perkembangan sel spermatogonium hingga pembentukan spermatid dimana sel spermatogeniknya memang sudah menurun. Spermatid merupakan tahap akhir dari spermatositogenesis dan awal dari fase spermiogenesis. Pada fase ini pembentukan spermatozoa sangat menentukan.

Hesperidin yang diberikan per oral mengakibatkan penurunan jumlah sel spermatozoa pada setiap kelompok perlakuan. Seperti hasil penelitian jumlah sel spermatid, perlakuan dua (P_2) dan perlakuan tiga (P_3) jumlah sel spermatozoa berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$). Jumlah spermatozoa paling sedikit terdapat pada perlakuan tiga (P_3). Poernomo *dkk.* (1999) menyatakan spermiogenesis ditandai dengan spermatid yang merupakan metamorfosis dan berubah bentuknya

menghasilkan spermatozoa yang sempurna. Pada proses ini tidak terjadi pembelahan sel tetapi suatu proses dari transformasi sel yaitu aparat golgi menjadi tudung anterior atau akrosom, inti spermatid menjadi kepala sperma, sentriol keluar flagela, plasma membran menjadi selubung tubuh sperma dan mitokondria mengumpul di bagian ekor. Saat transformasi sel inilah hesperidin akan mengganggu perubahan inti spermatid menjadi kepala sperma. Kepala sperma dilengkapi dengan akrosom yang mengandung enzim hyaluronidase, akrosin dan penetrasi corona yang memiliki peranan penting dalam fertilisasi (Gilbert, 1988).

Spermatozoa merupakan tahap akhir dari spermiogenesis dan pada pembentukan menjadi spermatozoa inilah diduga menjadi target sel pemberian hesperidin. Flavonoid dari hesperidin akan menurunkan enzim hyaluronidase yang berperan pada saat fertilisasi yaitu berfungsi untuk membuka matrik kumulus ooforus dengan melarutkan asam hyaluronat (Widjiati dkk., 1997).

Seperti yang dikemukakan oleh Prajogo dkk. (1994) pada penelitian pendahuluan infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* dapat menurunkan kadar testosteron tikus. Pada daun tersebut diketahui komponen dominan adalah golongan flavonoid tetapi flavonoid tersebut tidak bekerja secara langsung menghambat hormon testosteron melainkan sifat sitotoksik inilah yang menyebabkan efek tidak langsung terhadap sekresi hormon testosteron.

Pada penelitian ini didapatkan hesperidin mempunyai pengaruh dapat menghambat spermatogenesis. Penghambatan ini mengakibatkan penurunan jumlah atau secara morfologis bentuk spermatozoa tidak sempurna. Ketidakefektifan bentuk spermatozoa ini mengakibatkan spermatozoa menjadi lemah sehingga banyak yang mati atau berkurang jumlahnya. Sel spermatogenik yang mati akan difagosit oleh sel sertoli (Hafez, 1993). Selain itu apabila sel spermatozoa tersebut sudah keluar dari tubulus seminiferus maka akan diserap oleh sel epitelium epididimis dan duktus deferens. Ada juga yang diekskresikan melalui urin (Frandsen, 1992).

Pendapat serupa disampaikan oleh Cheryle dan Marvin yang dikutip oleh Projogo (1988) bahwa flavonoid adalah bahan yang bersifat sitotoksik. Apabila bahan tersebut diberikan pada hewan coba dengan dosis berlebih, maka akan terjadi penurunan jumlah sel spermatogenik karena sel-selnya mengalami degenerasi yang kemudian difagosit oleh sel sertoli. Kemungkinan hal tersebut juga terjadi pada hewan yang diberi hesperidin per oral dosis 200 dan 300 mg/kg bb.

Gambaran histologi hasil penelitian ini secara keseluruhan dari tahapan spermatogenesis yang terdiri atas: spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid, dan spermatozoa menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan khususnya pada P₃ terlihat adanya ruang-ruang kosong di dalam tubulus seminiferus dibandingkan kontrol. Pada kelompok kontrol sel-sel spermatogeniknya tersusun secara rapat

dari spermatogonium yang dekat dengan membrana basalis hingga spermatozoa yang dekat ke arah lumen. Sesuai dengan pendapat Prajogo *dkk.* (1997) semakin besar dosis yang diberikan semakin besar ruang-ruang kosong tersebut terdapat pada tubulus seminiferus. Hal ini disebabkan karena terjadi hambatan terhadap proses pembentukan sel-sel spermatogenik yang seharusnya mengisi ruang-ruang kosong tersebut.

Namun sejauh ini belum diketahui secara pasti mekanisme utama kerja hesperidin hingga mengakibatkan sitotoksik terhadap sel spermatogenik pada masing-masing kelompok.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian hesperidin secara oral, selama 52 hari dengan dosis 100 mg/kg bb (P_1), 200 mg/kg bb (P_2) dan 300 mg/kg bb (P_3) pada mencit (*Mus musculus*) jantan mempunyai pengaruh sebagai berikut :

1. Tidak mempengaruhi perkembangan diameter tubulus seminiferus.
2. Pemberian hesperidin dosis 200 mg/kg bb sudah mampu menurunkan jumlah sel spermatogenik.

IV.2. Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut terhadap motilitas dan viabilitas sel spermatozoa mencit setelah pemberian hesperidin.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang efek samping terhadap organ lain.

RINGKASAN

Santi Wulandari. Pemerintah dalam usahanya menekan laju pertumbuhan penduduk telah mencanangkan program Keluarga Berencana (KB) dengan metode kontrasepsi dan sterilisasi. Salah satu metode kontrasepsi yang dicoba untuk dikembangkan adalah metode kontrasepsi yang bersifat enzimatis. Bersifat enzimatis artinya metode kontrasepsi yang didasarkan pada mekanisme penghambatan aktivitas enzim yang berperan pada proses fertilisasi. Salah satu bahan yang mempunyai kemampuan sebagai penghambat aktivitas enzim terutama pada pejantan yaitu hesperidin.

Hesperidin adalah salah satu flavonoid yang berperan sebagai antifertilitas. Hesperidin selain menurunkan kadar enzim hyaluronidase ternyata juga bersifat sitotoksik terhadap sel-sel germinal testis yang menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian per oral hesperidin terhadap spermatogenesis mencit (*Mus musculus*) jantan.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan umur dua sampai tiga bulan sebanyak 40 ekor. Mencit dibagi secara acak menjadi empat kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor (ulangan). Kelompok kontrol tanpa diberi hesperidin tetapi diberi aquadest, kelompok P₁, P₂ dan P₃ masing-masing diberikan hesperidin dosis 100, 200, 300 mg/kg bb setiap hari selama 52,

hari ke-54 mencit dibunuh dengan memberikan kloroform kemudian diambil testisnya untuk dibuat sediaan histologi. Pengamatan dilakukan untuk mengukur diameter tubulus seminiferus, menghitung jumlah sel spermatogonium, sel spermatosit, sel spermatid dan sel spermatozoa.

Penelitian ini menggunakan disain Rancangan Acak Lengkap. Data dianalisis menggunakan sidik ragam yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5%.

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan diameter tubulus seminiferus bila dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$). Pada sel spermatogenik hasil penelitian menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel spermatogenik dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, 1989. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 11th. Ed. Merck and Co, Inc. New York. 4590.
- Ameer, B., R.A. Weintraub, J.V. Johnson, R.A. Yost and R.L. Rouseff. 1996. Flavanone Absorption after Narigin, Hesperidin and Citrus Administration. *J. Clin-Pharmacol-ter.* 60 (1): 34-40.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction 3rd. Ed. Prentice Hall Englewood Cliffs. New Jersey.
- Bloom, W., and D.W. Fawcett. 1992. A Text Book Of Histology. 9th. Ed. W.B. Saunder Co. Philadelphia. Igaku Shoin Ltd. Tokyo. 685-708.
- Dellman, H.D. and E.M. Brown. 1992. Buku teks Histologi veteriner. Terjemahan: R. Hartono dan S.S. Juwono. Universitas Indonesia Jakarta. 451-461.
- Franson, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 752-791.
- Fransworth, N.R. and D.P. Walter. 1982. Current status of plant products reported inhibit sperm. *J. research Frontiers in Fertility regulation.* 2 (1). 12.
- Ganong, W.S. 1990. Fisiologi Kedokteran. Edisi 4. Terjemahan: A. Darma E.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 373-379.
- Geneser, F. 1992. Atlas Berwarna Histologi. Terjemahan: J. Tambajong Binarupa Aksara. Jakarta. 182-185.
- Gilbert, S.F. 1988. Development Biology. 2th. Ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 34-56, 782-787.
- Griffit, L.A. 1982. Mamalian Metabolism of Flavonoid, in *The Flavonoid: Advances in Research* (J.B. Harborne and T.J. Mabey, Eds) Chapman and Hall. London-New York. 681-715.
- Gyorgyi and A. Szent. 2000. <http://www.symmcorp.com/info/hesperidin/htm>
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 3-8, 165-186.

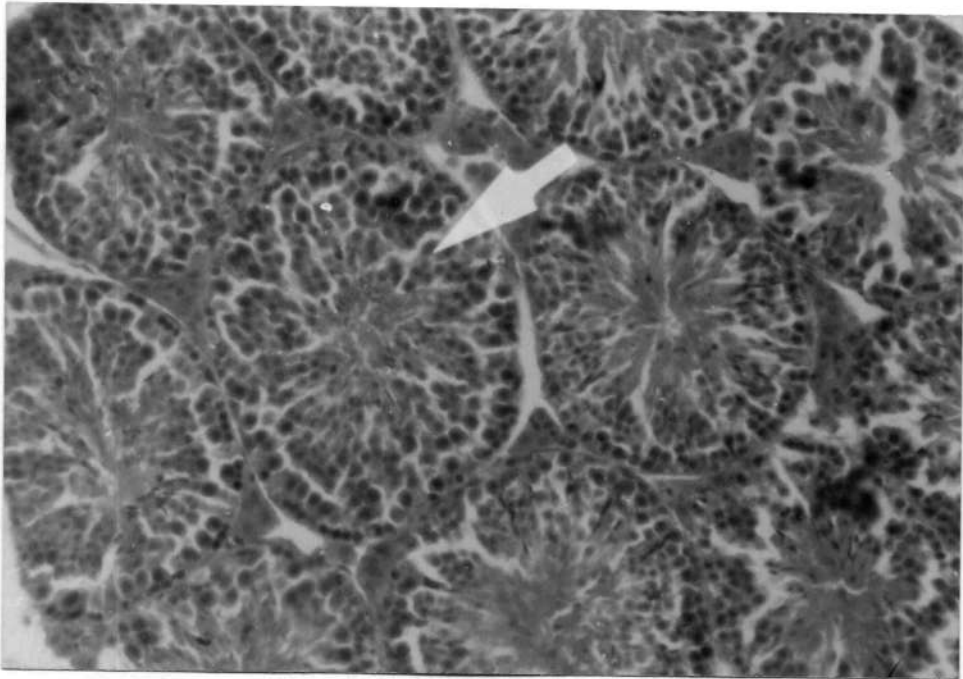
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ismudiono. 1996. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi Pertama. Laboratorium Fisiologi Reproduksi Jurusan reproduksi dan Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 9-15, 25-33.
- Jungueira, L.C. dan J. Carneiro. 1994. Histologi Dasar. Ed. 3. Terjemahan: A. Darma. C.V. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. 444-462.
- Kawabe, M., S. Tamano, M.A. Shibora, M. Hirose, S. Fukushima and N. Ito. 1993. Subchronic Tixicity Study of Methil Hesperidin in Mice. J. Toxicol-Lett. 69 (1): 37-44.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perencanaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 53-92.
- Leeson, T.S. dan Leeson. 1994. Histologi. W.B. Ed. V. Saunder Company. Philadelphia. Terjemahan: Staf Ahli Histologi FKUI. 511-533.
- Li, M.W., A.I. Yudin, C.A. Vande Voort, K. Sabeur, P. Primakoff and J.W. Overstreet. 1997. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by favonoids. J. Biol-Reprod. 56 (6). 1383-9.
- Markham, K.R. 1988. Cara Identifikasi Flavonoid. Penerbit Institut Teknologi Bandung. 27-29.
- Poernomo, B. S., Widjiati, E.M. Luqman, M. Mafruchati dan D.M. Endang. 1999. Diktat Embriologi. Laboratorium Ilmu Mudigah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 10-35.
- Prajogo, E.W.B. dan S. Pramono. 1988. Isolasi Glikosida Flavonoid dari Daun Gendarussa. Disampaikan pada Simposium Penelitian Tumbuhan Obat IV. Lokakarya Metode Penelitian Tumbuhan Obat Penyuluhan Expo III dan Mukthamar IV Perkumpulan Peneliti Bahan Obat Alam. Jakarta. 1-10.
- Prajogo, E.W.B., K. Emmy, Suhartono, R. Imam, I. Noor dan I.G.P. Santa. 1994. Bioactivity Study on Decoction and Extracts of *Justicia gendarussa* *Burm. f.* ASOMPS VIII. UNESCO. Malaka. Malaysia.
- Prajogo, E.W.B., A. Hartati, Sutarjadi dan P. Onny. 1997. Pengaruh Pemberian Per oral Ekstrak Diklormetan dan Ekstrak Metanol

Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Spermatozoa Epididimis Mencit. Simposium Penelitian Bahan Obat Alam IX. Yogyakarta.

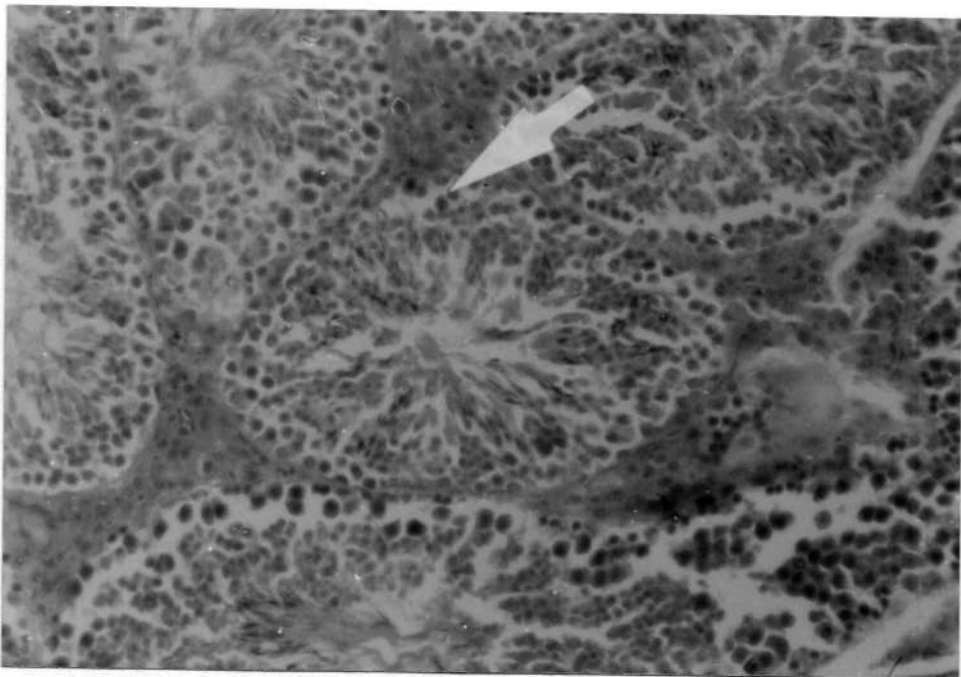
- Prajogo, E.W.B., A. Hinting dan Widjiati. 1997. Efek Inhibitor Fraksi Diklormetan dan Metanol dari *Justicia gendarussa* Burm. f. Terhadap Enzim Hyaluronidase Mencit. Simposium Penelitian Bahan Obat Alam IX. Yogyakarta. 2-33.
- Rois, M. F. 2000. Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*) Jantan. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rouseff, R.L., S.F. Martin and C.O. Yautae. 1987. Quantitative Survey of Narirutin, Narigin, Hesperidin and Neohesperidin in Citrus. J. Agric. Food Chem. 35. 1027-1030.
- Salisbury, G.W. dan N.L. Denmark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan: R. Djanuar. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 207- 210.
- Smith, J.B. dan S. Mangkowitz. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Universitas Indonesia. 10-11.
- Tedja, H. 1993. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Manggis Terhadap berat dan Gambaran Histologi Testis Mencit. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Tomaszewska, W.M., I.K. Utama., I.G. Putu dan T.D. Caniago. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. Penerbit Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 4-18.
- Trease, G.E. and W.C. Evans. 1985. Pharmacognosi. 12th. Ed. London. 299-301.
- Turner, C.D. dan J.T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum. Penerbit Airlangga University Press. 507-559.
- Whitingham, D.G. and M.J. Wood. 1992. Reproduction and Physiology Ln. Foster, H.L.J.D. Smal and J.G. Fox. The Mouse in Biomedical Research. Ed. II. Vol II. Academic Press Linc. Boston. 453-457.
- Widjiati, E.W.B. Prajogo, Hamdani dan H. Aucky. 1997. Hambatan Hesperidin Terhadap Penetrasi Spermatozoa Mencit Dalam Proses Fertilisasi *In Vitro*. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX. Yogyakarta.

Zaneveld, LJD. 1976. Sperm Enzym Inhibitors an Antifertility Agent, in: Human Semen and Fertility Regulation in Man. E.S.E. Hafez (Ed). London. 576-578.

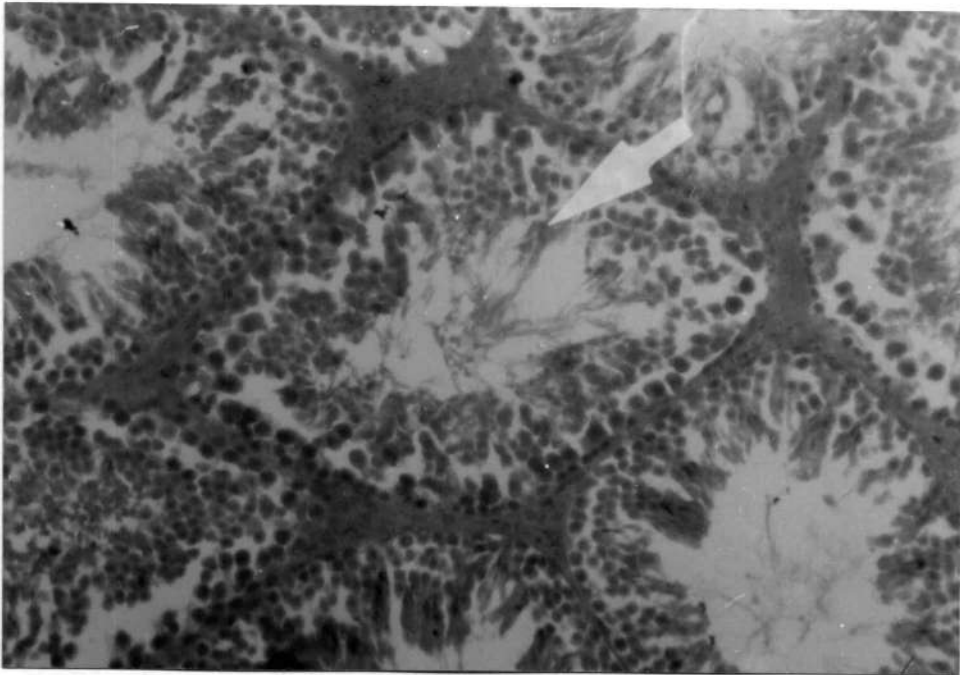
Gambar



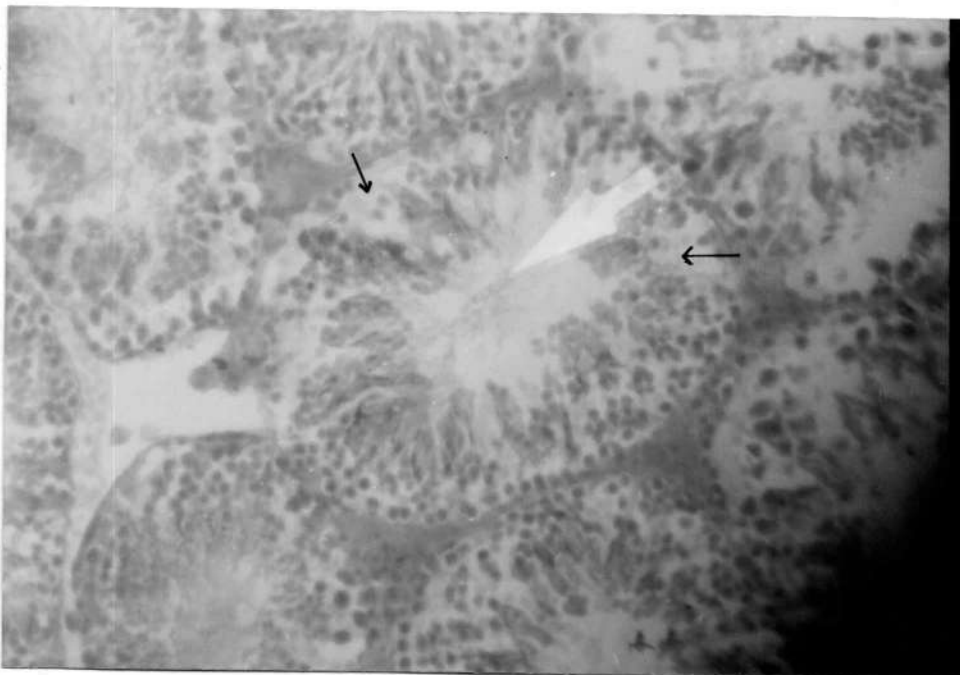
**Gambar 3. Histologi Testis Pada Kelompok Kontrol (P_0).
Pembesaran 400x
(Tanda panah menunjukkan sel spermatosit primer)**



**Gambar 4. Histologi testis setelah pemberian hesperidin dosis
100 mg/kg bb (P_1). Pembesaran 400x.
(Tanda panah menunjukkan sel spermatogonium)**



Gambar 5. Histologi testis setelah pemberian hesperidin dosis 200 mg/kg bb (P₂). Pembesaran 400x.
(Tanda panah menunjukkan sel spermatid)



Gambar 6. Histologi testis setelah pemberian hesperidin dosis 300 mg/kg bb (P₃). Pembesaran 400x.
(Tanda panah putih adalah lumen dari tubulus seminiferus, sedangkan tanda panah hitam adalah ruang-ruang kosong yang seharusnya diisi oleh sel sel spermatogenik).



Gambar 7. Pemberian Hesperidin Per Oral Pada Mencit (*Mus musculus*) jantan.

Lampiran

Lampiran 1. Evaluasi Statistik Diameter Tubulus Seminiferus dalam mikrometer dengan Mikroskop Pembesaran 100x.

Ulangan	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
1	127,33	122,7	138,9	134,27
2	122,68	134,27	134,27	136,59
3	136,59	127,33	131,96	131,96
4	131,96	134,27	120,38	125,01
5	127,33	123,16	134,27	134,27
6	129,64	129,64	129,64	127,33
7	131,96	127,33	134,27	129,64
8	138,9	131,96	134,29	136,59
9	127,33	136,59	131,96	122,7
10	131,96	125,01	138,9	120,38
ΣX	1305,68	1292,26	1328,84	1298,74
X	130,568	129,226	132,884	129,874
SD	4,7846	4,9115	5,2568	5,8213

$$FK = \frac{(5225,52)^2}{40} = 682651,4818$$

$$JKT = (127,33)^2 + (122,68)^2 + \dots + (120,38)^2 - 682651,4818$$

$$= 683704,5968 - 682651,4818$$

$$= 1053,115$$

$$JKP = \frac{(1305,68)^2 + (1292,26)^2 + (1328,84)^2 + (1298,74)^2}{10} - 682651,4818$$

$$= 682727,7503 - 682651,4818$$

$$= 76,2685$$

$$JKS = 1053,115 - 76,2685$$

$$= 976,8465$$

Kuadrat tengah dihitung sebagai berikut:

$$KTP = \frac{76,2685}{3} = 25,4228$$

$$KTS = \frac{976,8465}{36} = 27,1346$$

$$F_{hit} = \frac{25,4228}{27,1346} = 0,9369$$

Daftar Sidik Ragam

S.K	db	JK	KT	F _{hit}	F _{tabel}	
					0,05	0,01
Perlakuan	3	76,2685	25,4228	0,9369	2,862	4,372
Sisa	36	976,8465	27,1346			
Total	39	1053,115				

Setelah diuji dengan sidik ragam ternyata $F_{hitung} < F_{tabel} (0,05)$, sehingga dari keempat perlakuan tersebut tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap diameter tubulus seminiferus.

Lampiran 2. Evaluasi Statistik Jumlah sel Spermatogonia dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin.

Ulangan	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
1	36,5	34,4	32,7	33
2	32,3	35	32,2	28,3
3	35	32,7	33	30,7
4	33	30,2	36	32,2
5	38	36	32	34
6	34,7	34	35	31
7	37	36,3	30,8	32,5
8	36,2	35	32,3	28,2
9	33,3	33	34,8	34
10	35,8	37,8	31	29,8
ΣX	351,8	344,3	329,8	313,7
X	35,18	34,43	32,98	31,37
SD	1,8642	2,1370	1,7415	2,1330

$$FK = \frac{(1339,6)^2}{40} = 44863,204$$

$$\begin{aligned} JKT &= (36,5)^2 + (32,3)^2 + \dots + (29,8)^2 - 44863,204 \\ &= 45088,8 - 44863,204 \\ &= 225,596 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{(351,8)^2 + (344,3)^2 + (329,8)^2 + (313,7)^2}{10} - 44863,204 \\ &= 44948,146 - 44863,204 \\ &= 84,942 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= 225,596 - 84,942 \\ &= 140,654 \end{aligned}$$

Kuadrat tengah dihitung sebagai berikut:

$$KTP = \frac{84,943}{3} = 28,314$$

$$KTS = \frac{140,654}{36} = 3,907$$

$$F_{hit} = \frac{28,314}{3,907} = 7,247$$

Daftar Sidik Ragam

S.K	db	JK	KT	F _{hit}	F _{tabel}
					0,05
Perlakuan Sisa	3 36	84,942 140,654	28,314 3,907	7,247	2,862
Total	39	225,596			

Analisa data dengan menggunakan uji F menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0,05), sehingga dari keempat perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah spermatogonium.

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%)

$$BNT (\alpha) = t (\alpha) \text{ (db. Sisa)} \times \sqrt{\frac{2 \cdot KTS}{n}}$$

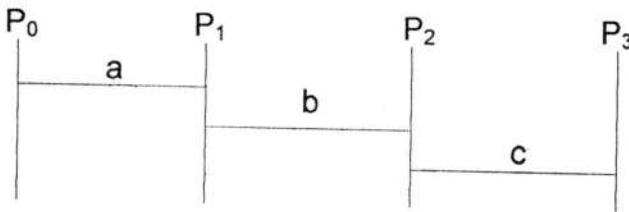
$$BNT (5\%) = t (5\%) \text{ (36)} \times \sqrt{\frac{2 \times 3,907}{10}}$$

$$= 2,028 \times 0,884$$

$$= 1,793$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Beda Selisih			BNT 5%
		X-P ₃	X-P ₂	X-P ₁	
P ₀	35,18 ^a	3,81*	2,2*	0,75	1,793
P ₁	34,43 ^{ab}	3,06*	1,45		
P ₂	32,98 ^{bc}	1,61			
P ₃	31,37 ^c				

Notasi:

Analisis statistik dengan uji BNT 5% menunjukkan kelompok kontrol/P₀ (pemberian aquades) mempunyai jumlah spermatogonium terbanyak yang tidak berbeda nyata dengan pemberian hesperidin dosis 100 mg/kg bb (P₁). Jumlah spermatogonium paling sedikit pada pemberian dosis 300 mg/kg bb (P₃) meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan dua dosis 200 mg/kg bb (P₂).

Lampiran 3. Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatisit Primer dan Spermatisid Sekunder dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin.

Ulangan	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
1	48,2	46,5	43	41
2	43,7	44	46,5	39,3
3	42,3	40	42	42,5
4	44	43	45,2	44,2
5	50,8	48,2	40,2	46
6	47	45	45	38
7	45,3	43	40	44,5
8	49,5	40,7	41,8	40,2
9	43	45,2	43,5	42
10	47,3	46,8	44,5	43
ΣX	461,1	442,4	431,7	420,7
X	46,11	44,24	43,17	42,07
SD	2,8900	2,6349	2,1751	2,4904

$$FK = \frac{(1755,9)^2}{40} = 77079,620$$

$$\begin{aligned} JKT &= (48,2)^2 + (43,7)^2 + \dots + (43)^2 - 77079,620 \\ &= 77404,49 - 77079,620 \\ &= 324,87 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{(461,1)^2 + (442,4)^2 + (431,7)^2 + (420,7)^2}{10} - 77079,620 \\ &= 77168,435 - 77079,620 \\ &= 88,815 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= 324,87 - 77079,620 \\ &= 236,055 \end{aligned}$$

Kuadrat tengah dihitung sebagai berikut:

$$KTP = \frac{88,815}{3} = 29,605$$

$$KTS = \frac{236,055}{36} = 6,557$$

$$F_{hit} = \frac{29,605}{6,557} = 4,515$$

Daftar Sidik Ragam

S.K	db	JK	KT	F _{hit}	F _{tabel}
					0,05
Perlakuan Sisa	3 36	88,815 236,055	29,605 6,557	4,515	2,862
Total	39	324,87			

Analisa data dengan menggunakan uji F menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0,05), sehingga dari keempat perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah spermatosit.

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%)

$$BNT (\alpha) = t (\alpha) (db. Sisa) \times \sqrt{\frac{2 \cdot KTS}{n}}$$

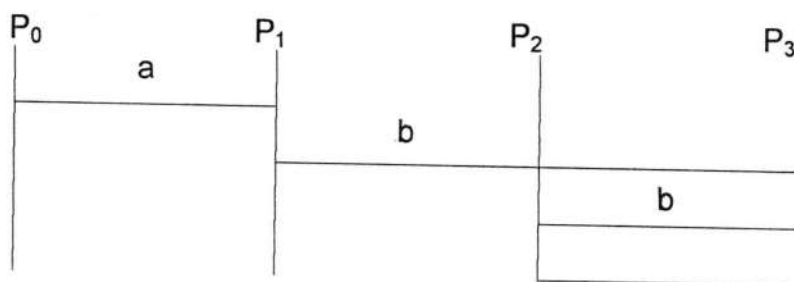
$$BNT (5\%) = t (5\%) (36) \times \sqrt{\frac{2 \times 6,557}{10}}$$

$$= 2,028 \times 1,145$$

$$= 2,322$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Beda Selisih			BNT 5%
		X-P ₃	X-P ₂	X-P ₁	
P ₀	46,11 ^a	4,04*	2,94*	1,87	2,322
P ₁	44,24 ^b	2,17*	1,07		
P ₂	43,17 ^b	1,1			
P ₃	42,07 ^b				

Notasi:

Analisis statistik dengan uji BNT menunjukkan kelompok kontrol/P₀ mempunyai jumlah spermatisit terbanyak dibanding lainnya meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan satu (P₁). Jumlah spermatisit paling sedikit terdapat pada pemberian hesperidin dosis 300 mg/kg bb (P₃) yang tidak berbeda nyata dengan P₁ dan P₂.

Lampiran 4. Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatid dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin

Ulangan	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
1	45	43,2	38,8	37
2	42,5	39	40,5	35,5
3	39,8	35,2	37,2	39
4	41	40,7	36	36,2
5	46,2	44,8	41,8	39,5
6	42	38	40,5	34,2
7	40	41	38	38,3
8	45	37	35,5	31,5
9	40,2	35,5	38,5	35,7
10	43,7	44,2,7	40	36,8
ΣX	425,4	397,1	386,8	363,7
X	42,54	39,71	38,68	36,37
SD	2,3320	3,3084	2,0574	2,3730

$$FK = \frac{(1573)^2}{40} = 61858,225$$

$$\begin{aligned} JKT &= (45)^2 + (42,5)^2 + \dots + (36,8)^2 - 61858,225 \\ &= 62455,58 - 61858,225 \\ &= 597,355 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{(425,4)^2 + (397,1)^2 + (386,8)^2 + (363,7)^2}{10} - 61858,225 \\ &= 62054,55 - 61858,225 \\ &= 196,325 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= 597,355 - 196,325 \\ &= 401,03 \end{aligned}$$

Kuadrat tengah dihitung sebagai berikut:

$$KTP = \frac{196,325}{3} = 65,442$$

$$KTS = \frac{402,03}{36} = 11,140$$

$$F_{hit} = \frac{65,442}{11,140} = 5,875$$

Daftar Sidik Ragam

S.K	db	JK	KT	F _{hit}	F _{tabel}
					0,05
Perlakuan	3	196,325	65,442	5,875	2,862
Sisa	36	401,03	11,140		
Total	39	597,355			

Analisa data dengan menggunakan uji F menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0,05), sehingga dari keempat perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah spermatid.

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%)

$$BNT (\alpha) = t (\alpha) \text{ (db. Sisa)} \times \sqrt{\frac{2.KTS}{n}}$$

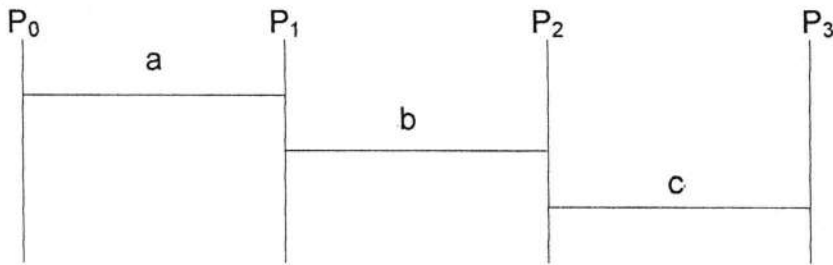
$$BNT (5\%) = t (5\%) \text{ (36)} \times \sqrt{\frac{2 \times 11,140}{10}}$$

$$= 2,028 \times 1,493$$

$$= 3,027$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Beda Selisih			BNT 5%
		X-P ₃	X-P ₂	X-P ₁	
P ₀	42,54 ^a	6,17*	3,86*	2,83	3,027
P ₁	39,71 ^{ab}	3,34*	1,03		
P ₂	38,68 ^{bc}	2,31			
P ₃	36,37 ^c				

Notasi:

Analisis statistik dengan uji BNT menunjukkan kelompok kontrol/P₀ mempunyai jumlah spermatid terbanyak dibanding lainnya meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan satu (P₁). Jumlah spermatid paling sedikit terdapat pada pemberian hesperidin dosis 300 mg/kg bb (P₃) yang tidak berbeda nyata dengan P₂.

Lampiran 5. Evaluasi Statistik Jumlah Sel Spermatozoa dalam Tubulus Seminiferus Testis Mencit Setelah Pemberian Hesperidin.

Ulangan	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
1	46	41,8	40,2	38,3
2	43,5	39,5	37,3	36,7
3	38,5	36,8	41	39
4	40,8	38,5	39,5	35,2
5	45,2	43	40	37,8
6	39,8	41,7	38,2	38,5
7	42,5	40,7	36	37,8
8	43	39	38	40
9	42,5	42,3	39,7	36,5
10	41,5	44,5	41	39,7
ΣX	423,3	407,8	390,9	379,5
X	42,33	40,78	39,09	37,95
SD	2,3017	2,3289	1,6543	1,4931

$$FK = \frac{(1601)^2}{40} = 64120,056$$

$$\begin{aligned} JKT &= (46)^2 + (43,5)^2 + \dots + (39,7)^2 - 64120,056 \\ &= 64371,87 - 64120,056 \\ &= 251,814 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{(423,3)^2 + (407,8)^2 + (390,9)^2 + (379,5)^2}{10} - 64120,056 \\ &= 64230,679 - 64120,056 \\ &= 110,623 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JKS &= 251,814 - 110,623 \\ &= 141,19 \end{aligned}$$

Kuadrat tengah dihitung sebagai berikut:

$$KTP = \frac{110,623}{3} = 36,874$$

$$KTS = \frac{141,191}{36} = 3,922$$

$$F_{hit} = \frac{36,874}{3,922} = 9,402$$

Daftar Sidik Ragam

S.K	Db	JK	KT	F _{hit}	F _{tabel}
					0,05
Perlakuan Sisa	3 36	110,623 141,191	36,874 3,922	9,402	2,862
Total	39	251,814			

Analisa data dengan menggunakan uji F menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0,05), sehingga dari keempat perlakuan tersebut terdapat perbedaan yang nyata terhadap jumlah spermatozoa.

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 5%)

$$BNT(\alpha) = t(\alpha) \text{ (db. Sisa)} \times \sqrt{\frac{2 \cdot KTS}{n}}$$

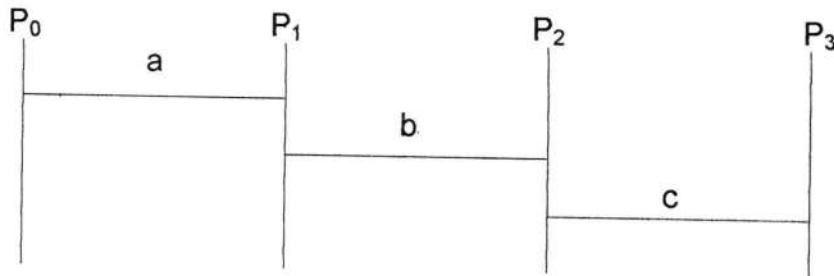
$$BNT(5\%) = t(5\%) \text{ (36)} \times \sqrt{\frac{2 \times 3,922}{10}}$$

$$= 2,028 \times 0,886$$

$$= 1,796$$

Selisih rata-rata perlakuan

Perlakuan	Rata-rata Perlakuan	Beda Selisih			BNT 5%
		X-P ₃	X-P ₂	X-P ₁	
P ₀	42,33 ^a	4,38*	3,24*	1,55	1,976
P ₁	40,78 ^{ab}	2,83*	1,69		
P ₂	39,09 ^{bc}	1,14			
P ₃	37,95 ^c				

Notasi:

Analisis statistik dengan uji BNT menunjukkan kelompok kontrol/P₀ mempunyai jumlah spermatozoa terbanyak dibanding lainnya meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan satu (P₁). Jumlah spermatozoa paling sedikit terdapat pada pemberian hesperidin dosis 300 mg/kg bb (P₃) yang tidak berbeda nyata dengan P₂.

Lampiran 6. Pembuatan Sediaan Histologi Testis

Pembuatan sediaan histologi ini dilakukan dilaboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dengan cara sebagai berikut:

a. Fiksasi dan Pencucian

Tujuan : Mencegah terjadinya degenerasi pasca mati.

Mematikan kuman atau bakteri.

Meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna.

Menjadikan jaringan lebih keras sehingga mudah dipotong.

Reagen : Formalin 10%

Cara kerja : Setelah diadakan seksi testis dimasukkan ke dalam formalin 10% selama 24 jam kemudian dicuci dengan air kran yang mengalir selama 30 menit.

b. Dehidrasi dan Clearing

Tujuan : Untuk menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Reagen : Alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II.

Cara kerja : Testis dimasukkan dalam reagen dengan urutan: alkohol 70%, 80%, 95%, 96%, alkohol absolut I, II, III, xylol I dan II masing-masing selama 30 menit.

c. Infiltrasi (embedding)

Tujuan : Untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin. Parafin akan menembus ruangan antar sel dan dalam sel sehingga lebih tahan terhadap pemotongan.

Reagen : Parafin I dan II

Cara kerja : Jaringan dimasukkan dalam parafin I yang mencair kemudian dioven 30 menit selanjutnya dimasukkan lagi ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 58 sampai 60°C.

d. Pembuatan balok parafin

Tujuan : Untuk memudahkan pemotongan jaringan

Reagen : Parafin cair

Cara kerja : Menyediakan cetakan besi yang sebelumnya diolesi gliserin untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan. Setelah parafin dituang pada cetakan, testis dimasukkan dengan pinset dan ditunggu sampai parafin membeku.

e. Pengirisan dengan Mikrotom

Tujuan : Memotong jaringan sehingga mudah dilihat di bawah mikroskop.

Alat : Mikrotom

Cara kerja : Pemotongan diambil secara random, tiap kali pemotongan diambil satu dengan tebal lima sampai tujuh mikron kemudian dicelupkan ke dalam air hangat dengan suhu 20 sampai 30°C sampai jaringan berkembang dengan baik dan mekar kemudian diletakkan pada gelas obyek yang telah diolesi dengan putih telur kemudian dikeringkan di atas hot plate.

f. Pewarnaan

Tujuan : Memudahkan melihat perubahan jaringan, digunakan pewarna Haematoxylin Eosin. Dengan pewarnaan ini dapat dilihat dengan jelas bentuk masing-masing selnya dimana sitoplasmanya berwarna merah sedangkan intinya berwarna biru.

Cara kerja : Pewarnaan HE dilakukan dengan metode Harris, dengan cara sebagai berikut: hepar yang mulai kering dimasukkan ke dalam xylol I selama tiga menit dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xylol II, kemudian alkohol absolut I dan II, alkohol 96%, 80%,

70%, dan air kran masing-masing satu menit. Selanjutnya hepar dimasukkan ke dalam zat warna Haematoxylin selama lima sampai sepuluh menit, air kran dua sampai lima menit, asam alkohol tiga sampai sepuluh celupan, air kran empat sampai tujuh celupan, amoniak enam celupan, air kran sepuluh menit, aquades secukupnya, zat warna Eosin selama seperempat menit, kemudian dimasukkan lagi ke dalam aquades secukupnya. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alkohol 70%, 80% masing-masing selama setengah menit, alkohol 96%, alkohol absolut I dan II selama satu menit. Kemudian dimasukkan ke dalam xylol I dan II selama satu sampai dua menit selanjutnya dibersihkan dari sisa-sisa pewarnaan.

g. Penutupan dengan gelas penutup

Obyek glass ditutup dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi dengan Canada Balsem yang dicampur dengan sodium karbonat.