

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI AIR CITRUS
NOBILIS LOUR TERHADAP PROFIL BAND
DNA SPERMATOZOA MENCIT
(MUS MUSCULUS)**



Oleh :

VISKI FITRI HENDRAWAN

NIM 060610030

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI AIR *CITRUS*
NOBILIS LOUR TERHADAP PROFIL BAND
DNA SPERMATOZOA MENCIT
(*MUS MUSCULUS*)**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk untuk
memperoleh gelar kedokteran hewan
Pada Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Oleh :

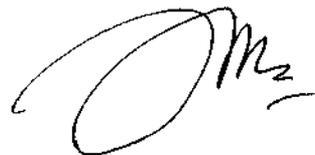
VISKI FITRI HENDRAWAN
060610030

Menyetujui

Komisi Pembimbing



(Trilas Sardjito S. M.Si. drh.)
Pembimbing Pertama



(Gracia Angelina Hendarti M.Si. Drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam hasil penelitian berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI AIR *CITRUS*
NOBILIS LOUR TERHADAP PROFIL BAND
DNA SPERMATOZOA MENCIT
(*MUS MUSCULUS*)**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 7 JUNI 2010



VISKI FITRI HENDRAWAN
NIM. 060610030

Telah dinilai pada seminar hasil penelitian

Tanggal : 1 Juni 2010

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, M.S., drh

Sekretaris : Dr. Sri Pantja Madyawati.,M.Si.,drh

Anggota : Dr. Pudji Srianto, M.kes., drh

Pembimbing Utama : Trilas Sardjito.S.,M.Si.,drh

Pembimbing Serta : Gracia Angelina Hendarti.,M.Si.,drh

Telah diuji pada

Tanggal : 15 Juni 2010

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, M.S., drh

Anggota : Dr. Sri Pantja Madyawati.,M.Si.,drh

Dr. Pudji Srianto, M.kes., drh

Trilas Sardjito.S.,M.Si.,drh

Gracia Angelina Hendarti.,M.Si.,drh

Surabaya, 03 Juni 2010

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Phd., Drh
NIP 19531216 197806 2 001

**THE INFLUENCE OF *Citrus nobilis* Lour WATER FRACTION AGAINST
DNA BAND PROFILE ON MICE (*Mus musculus*) SPERMATOZOA**

VISKI FITRI HENDRAWAN

ABSTRACT

Citrus nobilis Lour is one of herbal medicine which has anti fertility effect. *Citrus nobilis* Lour contains vitamin A, vitamin B, vitamin C, hesperidin, limonene, citral, and methylantranilate. Hesperidin is one of the substances in *Citrus nobilis* Lour which has the function to inhibit the activity of Hyaluronidase enzyme. To be able to use *Citrus nobilis* Lour as herbal medicine for contraception, toxicity and mutagenic examinations are required to prove that this substance is safe to be used. The configuration of total DNA in spermatozoa is one of the steps of mutagenic examination. Early indication to identify malfunction or mutation in spermatozoa can be seen in the alteration of spermatozoa DNA band profile using agarose electrophoresis method. The aim of this research is to identify spermatozoa DNA band profile of *Mus musculus* which has been treated by water fraction of *Citrus nobilis* Lour. In this study, the water fraction of *Citrus nobilis* Lour was given with doses: 40 mg/kg BW; 60 mg/kg BW and 80mg/kg BW per oral daily to male mice for once time of their spermatogenesis cycle (35 days). The result shows that spermatozoa from control and treatment group have the same total DNA number, 13118 bp. Conclusion : there is no significant change on DNA band profile of spermatozoa between control and treatment group.

Key words : *Citrus nobilis* Lour, profile of band DNA, agarose gel, hesperidin, spermatozoa

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Pemberian Fraksi Air *Citrus nobilis* Lour Terhadap Profil Band DNA Spermatozoa Mencit (*Mus Musculus*)**.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik, Phd., Drh atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Trias Sardjito.S.,M.Si.,drh selaku dosen pembimbing pertama dan Gracia Angelina Hendarti.,M.Si.,drh selaku dosen pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, M.S., Drh selaku ketua penguji skripsi, Dr. Sri Pantja Madyawati.,M.Si.,drh selaku sekretaris penguji skripsi, dan Dr. Pudji Srianto, M.kes., drh selaku anggota penguji skripsi atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan masukan yang sangat berharga demi perbaikan skripsi ini.

Tatik Hernawati, M.Si., Drh selaku dosen wali atas bimbingan dan nasihat-nasihat yang membangun selama ini. Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan

selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Kedua orangtua saya Drs. Anang Hendro Lukito dan Dr. Widjiati, M.Si., Drh, adik tercinta Dwi Rahmawati yang telah memberikan nasihat, motivasi, do'a dan dukungan baik material maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini.

Sahabat-sahabatku tercinta Theresia, Opik, Any, Wulan, Ertika, Andre, Beto, Andrika, Aris, Darmawan, Novi Yandi, Gilang, Dika, Putra, Faisol yang telah memberikan semangat dan motivasi hingga terselesainya skripsi ini. Teman-teman penelitian *Citrus* Ketut, Devi, Ratna, Mita, Anastasia terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini.

Teman-teman Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2006 dan teman – teman satu kost terima kasih atas bantuan, semangat, dan motivasi dalam penelitian ini. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan skripsi ini terima kasih atas bantuan kalian.

Akhirnya penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan makalah ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam makalah ini dapat bermanfaat bagi pembaca sekalian.

Surabaya, Mei 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Landasan Teori	5
1.4. Tujuan Penelitian	7
1.5. Manfaat Penelitian	8
1.6. Hipotesis	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. <i>Citrus nobilis</i> Lour	9
2.2. Sistem Reproduksi Jantan	11
2.2.1. Testis	11
2.2.2. Epididimis	12
2.2.3. Spermatozoa	14
2.2.4. Spermatogenesis	15
2.3. DNA	17
2.4. Mutasi	18
2.5. Elektroforesis Gel Agarosa	19
2.6. Hewan Coba	22
BAB 3 MATERI DAN METODE	24
3.1. Penelitian	24
3.2. Materi Penelitian	24
3.2.1. Bahan Penelitian	24
3.2.2. Alat Penelitian	24
3.3. Metode Penelitian	25
3.3.1. Persiapan Hewan Coba	25

3.3.2. Pembuatan Fraksi Air Citrus Nobulus Lour	25
3.3.3. Treatment Citrus Nobulus Lour	26
3.3.4. Koleksi Spermatozoa	27
3.3.5. Isolasi DNA Spermatozoa.....	27
3.3.6. Elektroforesis Gel Agarosa	28
3.4. Rancangan Penelitian.....	29
3.5. Peubah yang Diamati	29
3.5.1. Peubah Yang Diamati	29
3.5.2. Definisi Operasional	29
3.6. Analisa Data.....	30
3.7. Kerangka Penelitian.....	31
BAB 4 HASIL PENELITIAN	32
4.1 Fraksi Air <i>Citrus nobilis</i> Lour	32
4.2. Elektroforesis Gel agarosa.....	33
BAB 5 PEMBAHASAN	35
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
6.1. Kesimpulan	40
6.2. Saran	40
RINGKASAN	41
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Perhitungan jumlah pasangan basa DNA total kontrol, P1, P2 dan P3.....	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. <i>Citrus Nobilis</i> Lour	11
2.2. Spermatozoa Mencit	15
2.3. Spermatogenesis	17
2.4. Transilluminator dan kamera untuk mencetak DNA pada gel.....	21
2.5. Mencit	23
3.1. Kerangka penelitian	31
4.1. Hasil elektroforesis gel agarosa	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan dosis	48
Lampiran 2. Perhitungan Jumlah Pasangan Basa	49
Lampiran 3. Perlakuan Dengan <i>Citrus nobilis</i> Lour	51
Lampiran 4. Proses Isolasi DNA Spermatozoa	52
Lampiran 5. Proses Elektroforesis Gel Agarosa	53

DAFTAR SINGKATAN

A	: Adenine
BM	: Berat Molekul
Bp	: Base pair
C	: Cytosine
C ⁰	: Celcius
DNA	: Dioxiribo Nucleo Acid
Et Br	: Ethidium Bromide
G	: Guanine
GlcNAc	: Glukosamin n-asetat
GnRH	: <i>Gonadotropin Relasing Hormon</i>
HCl	: Asam klorida
Kb	: kilo base pair
M	: Molar
NaCl	: Natrium Clorida
NaOH	: Natrium Hidroksida
NaOAc	: Natrium Asetat
nm	: nano meter
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: power of Hidrogen
Rf	: Retardation Factor
RNA	: Ribo Nucleic Acid
rpm	: round per minute
T	: Thyamine
TE	: Tris EDTA
TBE	: Tris Buffer EDTA
U	: Urasil
µm	: Mikro mili
µl	: Mikro liter
UV	: Ultra Violet
V	: Volt

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tingginya minat masyarakat terhadap hewan kesayangan menyebabkan perawatan terhadap hewan kesayangan semakin baik. Seiring dengan tingginya minat masyarakat terhadap hewan kesayangan, jika populasinya tidak dibatasi maka dapat terjadi jumlah populasi yang berlebihan. Oleh karena itu tindakan yang paling tepat untuk memenuhi pembatasan populasi yaitu dengan pengendalian, Salah satunya dengan cara sterilisasi. Sterilisasi yang banyak dilakukan adalah kastrasi pada hewan jantan, sedangkan pada hewan betina dapat dilakukan dengan cara pengambilan ovarium (*ovariectomi*) dan uterusnya (*histerectomi*).

Kontrasepsi merupakan salah satu metode sterilisasi *non operatif* yang banyak digunakan. Menurut Zawistowski (2002), metode kontrasepsi dapat menghasilkan keuntungan yang sama dengan metode sterilisasi lainnya namun dengan biaya yang lebih murah dan resiko yang lebih ringan karena tidak melalui operasi. Penggunaan kontrasepsi pada hewan merupakan obyek yang banyak diteliti dan dikembangkan dan bisa dijadikan alternatif untuk mengontrol populasi hewan terutama hewan kesayangan.

Dalam pengembangan atau pencarian metode kontrasepsi pada hewan jantan, ada beberapa bagian pada proses reproduksi yang dapat dipengaruhi, antara lain pada spermatogenesis, maturasi spermatozoa didalam epidemis,

transportasi spermatozoa serta pada peleburan atau fusi dua sel kelamin (gamet) untuk membentuk individu baru tersebut (Gilbert, 1988).

Menurut Polakoski and Zaneveld (1976) yang dikutip Setiawan (2006) enzim hialuronidase berperan mendispersi *cumulus oophorus* sehingga spermatozoa mudah menembus lapisan terluar ovum. Terdapat beberapa bahan aktif yang menghambat enzim hialuronidase. Salah satu bahan aktif adalah hesperidin (Fransworth and Walter, 1982). Jika aktivitas enzim hialuronidase ini dapat dihambat maka diharapkan kemampuan spermatozoa untuk mendispersi *cumulus oophorus* berkurang sehingga memperkecil terjadinya fertilisasi.

Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan polifenol yang keduanya termasuk bahan inhibitor hialuronidase. Pada tahun 1948 sampai tahun 1954 banyak dilaporkan tentang aktivitas hesperidin per oral dan intraperitoneal yang dapat mencegah fertilisasi baik pada hewan maupun manusia (Zaneveld, 1976) yang dikutip dari Setiawan (2006). Oleh karena itu perlu dikaji kembali kemungkinan penggunaan hesperidin sebagai bahan kontrasepsi

Tanaman merupakan sumber utama yang digunakan sebagai bahan obat baru, termasuk obat kontrasepsi. Berbagai jenis tumbuhan liar yang ada di Indonesia dapat dijadikan bahan alami untuk membuat obat kontrasepsi. (Astirin dan Muthmainah, 2002). Indonesia adalah Negara tropis yang kaya akan tumbuh-tumbuhan, salah satunya adalah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour). Menurut Li (2002) yang dikutip Setiawan (2006) , kulit buah jeruk

keprok (*Citrus nobilis* Lour) mengandung berbagai komponen yaitu vitamin A, vitamin B, vitamin C, hesperidin, limonene, citral, dan methyl antranilate .

Menurut Mentari (2005) aktivitas hialuronidase diukur berdasarkan jumlah produk glukosamin n-asetat (GlcNAc) yang terbentuk. Hesperidin merupakan senyawa inhibitor hialuronidase tipe kompetitif reversibel dengan mekanisme reaksi enzimatik analog substrat. Hal ini disebabkan karena hesperidin memiliki struktur kimia yang mengandung gugus gula, sebagaimana yang dimiliki oleh GlcNAc. Pada mekanisme analog substrat ini, hesperidin terikat pada tempat aktif (*active site*) GlcNAc , sehingga akan menghalangi GlcNAc untuk berikatan pada asam hialuronat pada *cumulus oophorus*. Sehingga reaksi enzimatik dari hialuronidase dapat dihambat oleh keberadaan hesperidin sebagai senyawa inhibitorynya.

Pemberian fraksi air kulit buah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour) peroral dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/ kg BB, dan 300 mg/ kg BB telah dibuktikan dapat menghambat aktivitas hialuronidase spermatozoa mencit untuk mendispersi lapisan *cumulus oophorus* (Setiawan, 2006). Namun dari penelitian yang telah dilakukan belum diketahui efek samping pemberian *Citrus nobilis* Lour terhadap normalitas sel spermatozoa.

Menurut Astirin dan Muthmainah (2002), obat-obatan alami diharapkan mempunyai efek aman jika digunakan dan tidak menimbulkan efek samping yang merugikan. Oleh karena itu untuk dapat digunakan sebagai bahan kontrasepsi, *Citrus nobilis* Lour tidak boleh toksik ataupun tidak menyebabkan mutasi gen. Indikasi awal adanya mutasi gen dapat

diamati berdasarkan perbedaan profil band DNA setelah melalui teknik elektroforesis dengan gel agarosa. Elektroforesis gel agarosa merupakan metode yang sering digunakan untuk pemisahan dan identifikasi DNA. Teknik ini sederhana, cepat dalam pengerjaan, dan mampu memisahkan campuran fragmen DNA (Fatchiyah, 2006).

Pemberian bahan kimia dalam hal ini *Citrus nobilis* Lour pada spermatozoa secara terus-menerus dikhawatirkan akan mempengaruhi gen dasar asli (*wild tipe gen*) dalam sel, sehingga akan menyebabkan awal mutasi pada gen dasar asli. Perubahan pada awal mutasi ini bisa berupa hilangnya pasangan basa nukleotida maupun penambahan pasangan basa nukleotida. Disisi lain perubahan pada awal mutasi ini akan mengaktifkan sistem repair yang ada dalam sel untuk melakukan penggantian kerusakan basa nukleotida, memperbaiki dan melindungi basa nukleotida yang rusak, sehingga tidak terjadi mutasi dan perubahan pada panjang urutan basa nukleotida yang divisualisasikan pada gel agarosa dalam bentuk profil band DNA. Tetapi jika sistem repair yang ada didalam sel tidak mampu mencegah kerusakan pada awal mutasi, maka akan terjadi perubahan pada susunan basa nukleotida yang divisualisasikan pada gel agarosa dalam bentuk perbedaan profil band DNA antara kelompok kontrol dan perlakuan (Permana, 2008).

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka penelitian difokuskan untuk mengetahui profil band DNA spermatozoa mencit akibat pemberian *Citrus nobilis* Lour.

1.2. Rumusan Masalah

“Apakah terdapat perbedaan gambaran profil band DNA spermatozoa *Mus musculus* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang telah diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour?”

1.3. Landasan Teori

Pada tahun 1948 sampai dengan tahun 1954 banyak dilaporkan penelitian tentang aktivitas hesperidin. Pemberian hesperidin 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) yang dikutip Setiawan (2006).

Tanaman jeruk merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat obat. Spesies jeruk melalui berbagai macam penelitian yang telah dilakukan diketahui mengandung berbagai macam bahan aktif dengan berbagai macam kegunaan. Kandungan tersebut diantaranya berupa vitamin C, berbagai macam flavonoid asam (Morris, 2004). Di dalam kulit buah jeruk, mengandung komponen yaitu vitamin A, vitamin B, vitamin C, hesperidin, limonene, citral, dan methylantranilate (Li *et al*, 2002) yang dikutip Setiawan (2006). Kandungan hesperidin dalam kulit jeruk mampu menurunkan aktivitas enzim hialuronidase sehingga kemampuan spermatozoa mendispersi *cumulus oophorus* menurun hal ini akan menurunkan terjadinya proses fertilisasi.

Fertilisasi ovum oleh spermatozoa terkait dengan penetrasi spermatozoa kedalam ovum yang akan merangsang dimulainya perkembangan sel telur menjadi embrio. Pada saat penetrasi spermatozoa kedalam ovum, spermatozoa harus menembus lapisan tipis sel folikuler (*cumulus oophorus*) yang mengelilingi ovum. Spermatozoa akan mengeluarkan enzim hialuronidase yang akan mendispersikan lapisan sel folikuler ovum (Keeton, 1980). Adanya hambatan aktivitas enzim hialuronidase akan mengganggu kelangsungan proses berikutnya yang berakibat terjadinya kegagalan penetrasi.

Sebagai alternatif bahan kontrasepsi, kulit jeruk harus aman penggunaannya, tidak boleh menimbulkan efek samping bagi pemakainya yaitu tidak boleh toksik terhadap organ tubuh, tidak menimbulkan efek teratogenik dan tidak boleh menyebabkan mutagenik. Efek mutagenik dapat menyebabkan kelainan DNA jika bahan obat kontrasepsi dikonsumsi terus-menerus.

Untuk mengetahui efek mutagenik dari suatu bahan obat perlu dilakukan sequencing untuk menentukan urutan basa nukleotida. Namun sebelum dilakukan sequencing, tahapan yang harus dilalui adalah mengetahui profil band DNA dengan metode elektroforesis gel agarosa. Indikasi awal untuk melihat kelainan atau mutasi pada spermatozoa dapat dilakukan dengan melihat perubahan profil band DNA spermatozoa dengan metode elektroforesis gel agarosa (Yepyhardi, 2009).

Elektroforesis gel agarosa merupakan metode yang sering digunakan untuk pemisahan dan identifikasi DNA. Teknik ini sederhana, cepat dalam pengerjaan, dan mampu memisahkan campuran fragmen DNA (Fatchiyah, 2006).

Profil band DNA pada gel agarosa juga sangat dipengaruhi oleh ukuran protein, kerapatan atau konsentrasi gel agarosa dan arus listrik. Apabila ditemukan perbedaan profil band DNA dibandingkan dengan kelompok kontrol maka diduga ada kelainan pada urutan basa nukleotida dalam molekul DNA yang diindikasikan terjadi mutasi, untuk itu perlu dilakukan pengujian lebih lanjut (Erlich., 1989 yang dikutip Dewanti, 2005).

1.4. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui profil band DNA spermatozoa *Mus musculus* yang telah diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah

1. Dapat diketahui efek samping akibat pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour terhadap spermatozoa *Mus musculus* sebelum dimanfaatkan sebagai bahan kontrasepsi.
2. Data yang diperoleh dapat digunakan sebagai referensi untuk mendukung penelitian tentang *Citrus nobilis* Lour sebagai bahan kontrasepsi

1.6. Hipotesis

terdapat perbedaan gambaran laju migrasi profil band DNA spermatozoa *Mus musculus* akibat pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Citrus nobilis* Lour

Menurut Manner *et al* (2006) klasifikasi *Citrus nobilis* Lour (gambar 2.1) sebagai berikut :

- Kingdom : Plantae (tumbuhan)
- Sub Kingdom : Tracheobionta (berpembuluh)
- Super Divisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)
- Divisio : Magnoliophyta (berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
- Sub-kelas : Rosidae
- Ordo : Sapindales
- Familia : Rutaceae (suku jeruk-jerukan)
- Genus : *Citrus*
- Spesies : *Citrus nobilis* Lour

Buah jeruk yang telah masak dengan sempurna mengandung 77-92% air, kandungan gula bervariasi antara 2-15%, protein kurang dari 2% dan asam sitrat 1-2%. Disamping itu terdapat vitamin B, vitamin A serta vitamin C didalamnya (Ashari, 1995).

Pengembangan kontrasepsi dari bahan alam banyak dilakukan begitu pula dari tanaman *Citrus nobilis* Lour digunakan sebagai alternatif bahan kontrasepsi karena diketahui mampu menghambat fertilisasi (Gyorgy dan Szent, 2000). Pada studi pendahuluan yang mengarah anti fertilitas



Gambar 2.1. *Citrus nobilis* Lour

2.2. Anatomi Sistem Reproduksi Jantan

Alat reproduksi jantan meliputi alat kelamin utama yaitu testes, saluran reproduksi yang terdiri dari epididimis, vas deferens, ampula, urethra, dan kelenjar asesoris yaitu vesikularis, prostata, dan bulbourethralis, serta alat kelamin luar berupa penis, preputium dan skrotum.

2.2.1. Testis

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

Pada keadaan normal testes berbentuk bulat panjang dengan sumbu vertikal. Testis terbungkus dalam kantong skrotum, dalam skrotum berisi dua lobi testes yang masing-masing lobi mengandung satu testis. Testes sebagai organ kelamin utama memiliki dua fungsi yaitu fungsi

dilaporkan fraksi air kulit buah *Citrus nobilis* Lour mampu menurunkan fungsi penetrasi spermatozoa pada mencit (Setiawan, 2006).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa flavonoid merupakan zat berwarna merah, ungu, biru dan sebagian warna kuning yang ditemukan dalam tumbuhan termasuk kulit buah *Citrus nobilis* Lour (Griffit, 1982).

Menurut (Li, 2002) yang dikutip oleh Setiawan (2006) pada kulit buah *Citrus nobilis* Lour terdapat bioflavonoid berupa hesperidin, vitamin A, vitamin B, vitamin C, limonene, citral dan methyl antranilate. Hesperidin banyak terdapat pada familia Rutaceae seperti *Citrus* spp dan *Poncitrustriifoliata* serta pada familia Labiatae seperti *Mentha* dan *Hyssopus* spp (Robertson, 2004).

Hesperidin merupakan jenis glikosida flavanon yang termasuk dalam famili flavonoid dan banyak ditemukan pada seluruh spesies *citrus*. Hesperidin memiliki banyak efek biologis antara lain sebagai *anti-inflammatory*, antimikroba, antikarsinogenik, dan antioksidan (Garg *et al*, 2001). Penelitian Berkarda (1998) menyatakan bahwa hesperidin mampu menghambat inisiasi tumor pada kulit mencit dan memiliki efek inhibitor terhadap sel kanker. Sedangkan menurut penelitian Prajogo dkk (1997) hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan *inhibitor* hialuronidase.

reproduktif sebagai penghasil sel spermatozoa dan fungsi endokrinologis sebagai penghasil hormon jantan atau androgen (Ismudiono, 2007).

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 yang tidak normal, skrotum dapat melindungi testis dengan jalan mengerut atau mengendorkan dinding skrotum (Ganong, 1980; Hardjopranjoto, 1995).

2.2.2. Epididimis

Epididimis merupakan saluran reproduksi jantan yang terdiri dari tiga bagian yaitu caput epididimis, corpus epididimis dan cauda epididimis. Epididimis memiliki struktur memanjang yang bertaut rapat dari bagian distal testis sampai bagian anterior testis dan di dalamnya terdapat duktus epididimis yang berliku-liku. Duktus (vas) deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis dengan urethra. Urethra merupakan saluran urogenitalis untuk menyalurkan urine dan semen (Ismudiono, 2007).

Adapun epididimis mempunyai empat fungsi utama yaitu :

- a. Mengangkut spermatozoa dari rete testis ke duktus deferens (transportasi)
 - b. Membuat suspensi sperma encer yang berasal dari testis menjadi lebih pekat (konsentrasi)
 - c. Sebagai tempat pematangan spermatozoa (pendewasaan atau kapasitas)
 - d. Sebagai tempat penyimpanan spermatozoa.
- (Hafez, 1993)

Menurut Nalbandov (1990) maturasi spermatozoa di tandai dengan hilangnya protoplasmik droplet dari bagian kepala spermatozoa. Epididimis pada bagian kaput berfungsi untuk penyerapan cairan yang dikeluarkan oleh testis.

Selain mempunyai fungsi yang telah disebutkan diatas epididimis juga memiliki fungsi lainnya adalah memberikan sekresi cairan yang diproduksi oleh sel-sel epitel untuk membantu perubahan morfologi akrosom yaitu melalui kondensasi inti, pelepasan sitoplasma, peningkatan muatan negatif dan penambahan lapisan glikoprotein (Gilbert, 1988).

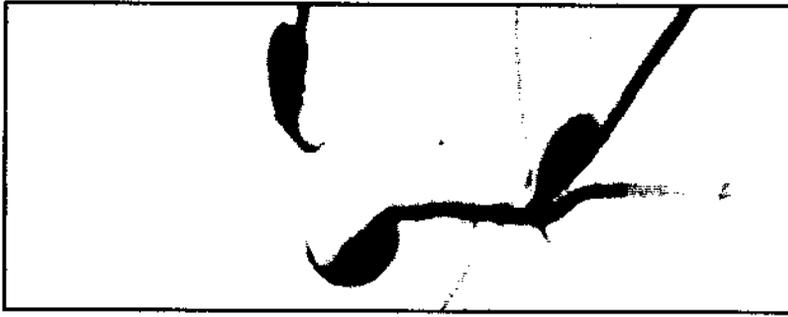
Sekresi plasma epididimis untuk pematangan spermatozoa. Pematangan spermatozoa di epididimis meliputi perubahan fisiologi, histokimia, morfologi, biokimia, dan biofisik. Perubahan morfologi yang paling mencolok yaitu droplet sitoplasma, sisa sitoplasma dari spermatid yang bergerak ke kauda dari leher spermatozoa ke bagian

akhir dari middle piece, droplet sitoplasma dibedakan dengan adanya enzim lisosom yang terlibat pada akhir maturasi spermatozoa di epididimis (Prajogo, 2002).

Dinding epididimis terdiri atas lapisan otot sirkuler dan epitel berbentuk kubus. Batas antara ketiga bagian dari epididimis dibedakan berdasarkan susunan histologinya. Pada bagian caput secara histologis dicirikan corpus dengan stereosilia yang tidak lurus dan lumen lebih lebar, sedangkan bagian cauda ditandai stereosilia yang pendek, lumen yang lebih lebar dan banyak timbunan sel spermatozoa (Ismudiono, 2007).

2.2.3. Spermatozoa

Spermatozoa (gambar 2.2) merupakan sel yang dihasilkan dari organ reproduksi jantan (testis) melalui suatu proses yang disebut spermatogenesis. Spermatozoa yang diproduksi testis adalah sel tunggal yang terdiri dari kepala, leher serta ekor dan panjangnya sekitar 50 μ m. Kepalanya berbentuk oval (lonjong). Bagian ekor bertanggung jawab atas produksi energi yang mampu memulai dan mempertahankan gerakan spermatozoa dan kepala yang berisi semua informasi DNA, maupun mekanisme untuk mengenali zona pellucida dan fusi dengan sel telur (Curry and Watson, 1995). Spermatozoa mengandung komponen kimia penting, baik yang terdapat pada permukaan sel, maupun yang didalam sel (Mann and Lutwak, 1981).



Gambar 2.2. Spermatozoa mencit dengan pembesaran 1750x
(Hafez, 2000)

Ada 2 macam spermatozoa menurut strukturnya yaitu spermatozoa tak berflagelum dan berflagelum. Spermatozoa tak berflagelum terdapat pada beberapa jenis invertebrata yakni Nematoda, Crustacea, Diplopoda. Sedangkan yang berflagelum pada umumnya terdapat pada hewan vertebrata. Yang berflagelum lazim memiliki bagian kepala dan ekor. Kepala sebagai penerobos jalan menuju dan masuk ke dalam ovum dan membawa bahan genetic yang akan diwariskan kepada anak-cucu. Ekor untuk pergerakan menuju tempat pembuahan dan untuk mendorong kepala menerobos selaput ovum. Dalam kepala terdapat akrosom dan inti. Akrosom ialah lisosom spermatozoon untuk melisiskan lendir penghalang saluran kelamin betina dan selaput ovum (Yatim, 1994).

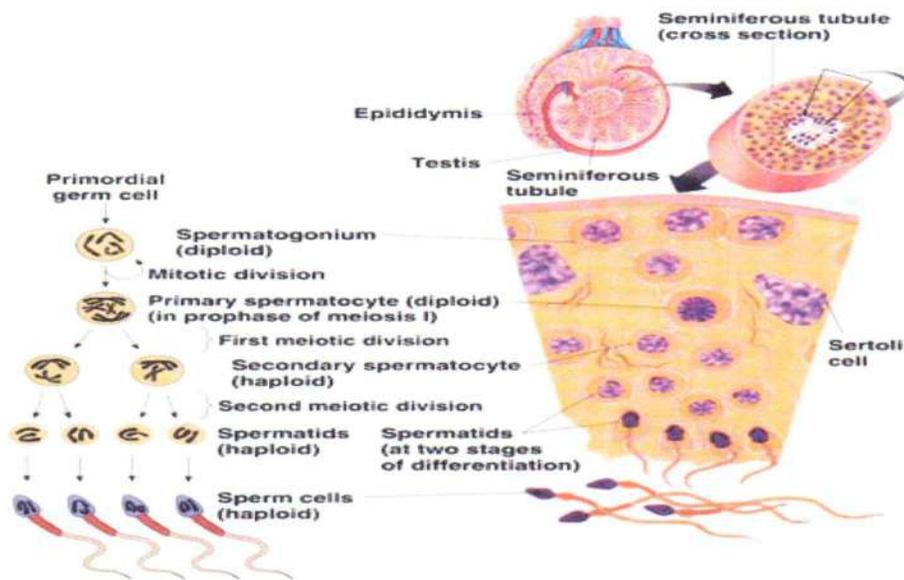
2.2.4. Spermatogenesis

Proses pembentukan spermatozoa disebut spermatogenesis (2.3). Spermatozoa berkembang dari spermatogonia yaitu sel epitel germinatif

yang tersusun di permukaan dalam dinding tubulus seminiferus yang berkembang dengan jalan pembelahan (Hardijanto dkk., 2008).

Proses spermatogenesis terdiri dari empat tahap yaitu : proliferasi, tumbuh, masak dan transformasi (metamorfosa). Proliferasi terjadi sejak pra lahir sampai beberapa waktu sesudah fetus dilahirkan dan setelah itu berhenti. Spermatogenesis baru diteruskan setelah individu menginjak umur dewasa kelamin. Pada tahap tumbuh spermatogonium aktif membelah diri secara mitosis sehingga tumbuh menjadi spermatosit primer. Tahap masak dimulai dengan pembelahan meiosis sehingga spermatosit primer berubah menjadi spermatosit sekunder yang jumlah kromosomnya setengah dari jumlah kromosom spermatosit primer. Pada tahap metamorfosa spermatid berubah menjadi spermatozoa yang prosesnya disebut spermiogenesis. (Purnomo dkk., 2005).

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 21 hari, sedangkan proses meiosis berlangsung membutuhkan selama 13,5 hari. Jadi siklus spermatogenesis secara lengkap pada mencit berlangsung selama 34,5 hari (Whittingham and Wood, 1992).



Gambar 2.3. Bagan spermatogenesis
(Sumber ::<http://iceteazegeg.wordpress.com/2009/02/25/gametogenesis>)

2.3. DNA (Deoxyribo Nucleic Acid)

DNA (deoxyribonucleic acid) merupakan materi genetik yang terutama didapatkan dalam kromosom, yang terletak dalam nukleus (inti) suatu sel. Selain itu sejumlah kecil DNA juga ditemukan di mitokondria. DNA termasuk asam nukleat dan seperti semua asam nukleat maka akan disusun oleh rangkaian molekul–molekul yang menyatu yaitu nukleotida. Asam nukleat bersifat linear karena merupakan polimer nukleotida yang tidak bercabang (Kimball, 2004).

Molekul DNA tersusun dalam untai / rantai heliks ganda (double–stranded helix atau double helix). Untai heliks ganda DNA mempunyai ciri–ciri, antara lain : Tersusun atas 2 untai polinukleotida yang saling melilit satu sama lain, setiap tulang punggungnya terdiri atas deoksiribosa dan kelompok fosfat yang berselang–seling. Purin atau pirimidin terikat pada setiap

deoksiribosa di bagian sumbu heliks. Setiap basa membentuk ikatan hidrogen dengan basa lawannya pada satu arah dan membentuk pasangan basa (juga disebut pasangan nukleotida).

2.4. Mutasi

Mutasi adalah perubahan kimia atau fisik yang merubah sekuens basa dalam molekul DNA. Mutasi dapat disebabkan oleh kesalahan penggandaan dalam materi genetik selama pembelahan sel dan oleh paparan radiasi, kimia, atau virus, atau dapat terjadi di bawah kontrol seluler selama proses meiosis atau hipermutasi (Hill, 1993).

Poin mutasi adalah mutasi yang melibatkan perubahan pasangan basa tunggal dalam molekul DNA. Tipe poin mutasi antara lain :

- a. Mutasi substitusi : Pada mutasi substitusi terjadi penggantian basa nitrogen yang berbeda pada nukleotida molekul DNA. Misalnya perubahan basa purin menjadi purin (transisi) atau pirimidin menjadi pirimidin ($A \leftrightarrow G, C \leftrightarrow T$). Selain itu, perubahan basa purin menjadi pirimidin dan sebaliknya (transversi) ($C/T \leftrightarrow A/G$). Ada tiga tipe mutasi ini, yaitu :
 - Silent mutasi : tidak ada perubahan asam amino.
 - Missense mutasi : menghasilkan perubahan asam amino tunggal dalam akhir polipeptida.
 - Nonsense mutasi : menggantikan kodon asam amino dengan satu diantara tiga stop kodon (UAA, UAG, UGA), sehingga proses

transkripsi berhenti sebelum waktunya dan protein yang dihasilkan kemungkinan tidak berfungsi (Martin, 1981).

- b. Frame shift mutasi : Penambahan (insersi) atau penghapusan (delesi) satu atau lebih basa nitrogen dalam molekul DNA. Hal ini akan menyebabkan perubahan kodon yang terbaca saat translasi, sehingga akan mengkode asam amino yang berbeda. Mutasi ini sering membentuk stop kodon, sehingga terjadi nonsense mutasi (Martin, 1981).

2.5. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis mempelajari perpindahan molekul yang bermuatan di medan listrik. Migrasi molekul di pengaruhi ukuran, bentuk, muatan dan komposisi kimia dari molekul. Elektroforesis relatif tidak mahal, teknik yang sering dipakai, dapat digunakan untuk analisis dan purifikasi beberapa tipe senyawa biomolekul yang berbeda dan khusus untuk protein dan asam nukleat (Boyer, 1993).

Elektroforesis modern menggunakan buffer jenuh sebagai tipe matriks gel pendukung medium. Sampel yang akan di analisa tampak sebagai spot atau band tipis, disebut elektroforesis zone. Migrasi dipengaruhi oleh medan listrik dan kerapatan (rigid) dari matriks gel pendukung (Boyer, 1993).

Perbedaan antara berbagai metode adalah tipe media pendukung, yaitu selulosa atau gel tipis. Selulosa digunakan sebagai media pendukung untuk senyawa biokimia yang mempunyai berat molekul kecil, misalnya asam

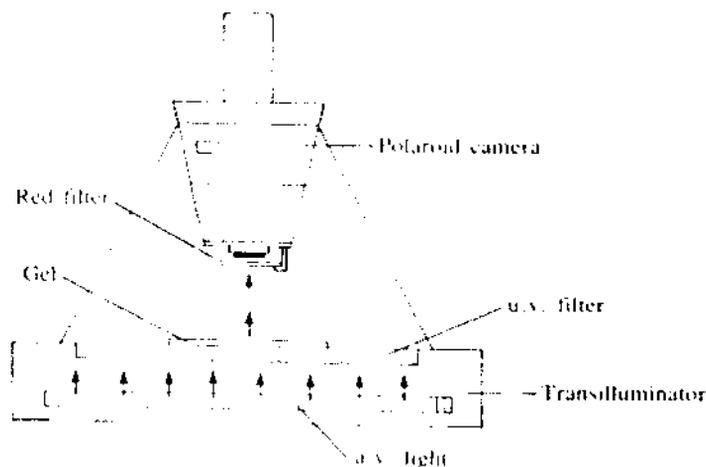
amino dan karbohidrat. Sedangkan poliakrilamid dan gel agarosa digunakan sebagai media pendukung senyawa dengan berat molekul besar (Boyer, 1993).

Pada awal perkembangan penelitian tentang DNA, DNA dipantau menggunakan perbedaan kecepatan pengendapan pada suatu kolom gradien sukrosa. Metode ini jauh lebih rumit dan membutuhkan waktu yang banyak. Metode tersebut kemudian diganti oleh metode elektroforesis gel. Metode yang sederhana ini cepat dalam pengerjaan, dan mampu memisahkan campuran fragmen DNA dengan derajat tinggi (Boyer, 1993).

Pada pH netral/basa, grup fosfat DNA memberikan bentuk baru yang bermuatan negatif tiap unit molekul DNA, karena itu ada perpindahan ke anode dalam medan listrik. Molekul yang berbeda ukurannya dapat dipisahkan oleh elektroforesis melalui matriks pendukung. Ukuran molekul DNA tergantung pada panjang rantai, sehingga ukuran molekul DNA ditentukan sebagai nomor pasangan basa. Matriks kurang resisten terhadap molekul yang kecil, dimana laju migrasi lebih cepat. Laju migrasi molekul di matriks tergantung pada ukuran pori gel yang ditentukan oleh konsentrasi agarose. Konsentrasi antara 0,5--2 % biasanya digunakan untuk DNA yang berukuran 200–50.000 pasangan basa. Pemisahan dapat dilakukan di peralatan vertikal atau horisontal di papan. Karena mudah digunakan, sistem elektroforesis papan horisontal lebih banyak digunakan dimana seluruh gel terendam dalam buffer (Holme, 1994).

Lokasi DNA dalam gel dapat ditentukan secara langsung oleh fluoresens dengan zat warna Ethidium bromide pada konsentrasi rendah. Lampu UV dapat menyebabkan kerusakan mata. Oleh karena itu, harus hati – hati ketika mengamati gel. Untuk mencegah paparan yang lama dari lampu UV, gel di foto sebagai hasil analisis. Transilluminator bersinar UV dengan panjang gelombang 300 nm pada gel dari bawah dan fluorescent emisi panjang gelombang 590 nm di foto dengan kamera polaroid. Filter merah dapat digunakan untuk meningkatkan kontras antara band fluorescent dengan back ground (Holme, 1994).

Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarosa di pengaruhi oleh beberapa faktor yaitu : ukuran molekul DNA, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, arus listrik yang dipakai, serta komposisi basa dan suhu (Sumitro, 1996).



Gambar 2.4. Transilluminator dan kamera untuk mencetak DNA pada gel (Holme, 1994)

2.6. Hewan Coba

Hewan coba (2.5) adalah hewan yang dapat digunakan untuk tujuan suatu penelitian. Hewan-hewan ini meliputi hewan laboratorium (hewan yang khusus dipelihara di laboratorium) hingga hewan ternak. Pemakaian hewan coba dilakukan dalam berbagai penelitian biomedikal seperti penelitian toksikologi, nutrisi, mikrobiologi, imunologi, pengembangan obat-obatan, vaksin dan produk-produk khusus (misalnya kosmetik, shampoo, dan pasta gigi) serta bedah. Selain itu, hewan coba dipakai untuk pembelajaran dalam dunia pendidikan (Kusumawati, 2004).

Beberapa penelitian membutuhkan hewan coba yang khusus. Mencit sering dipakai sebagai hewan model pertama untuk uji toksisitas atau untuk menentukan manfaat suatu bahan atau obat. Kelompok primata biasanya merupakan hewan coba terakhir yang ideal bila bahan atau obat yang bersangkutan akan digunakan untuk kepentingan manusia (Kusumawati, 2004)

Mencit yang sering digunakan untuk penelitian laboratorium adalah jenis *Mus musculus*. Bulu mencit ini berwarna putih, mata berwarna hitam dan kulit berpigmen. Berat badannya bervariasi tetapi umumnya pada umur 4 minggu berat badan mencapai 18-20 gram namun usia dewasa dapat mencapai berat hingga 40 gram (Smith dan Mankoewidjoyo, 1998).



Gambar 2.5. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit termasuk dalam genus *Mus*, *subfamily Murinae*, *family Muridae*, *order Rodentia*. Mencit yang sudah dipelihara di laboratorium sebenarnya masih ada satu famili dengan mencit liar. Sedangkan mencit yang paling sering dipakai untuk penelitian biomedis adalah *Mus musculus*. Berbeda dengan hewan-hewan lainnya, mencit tidak memiliki kelenjar keringat. Pada umur empat minggu berat badannya mencapai 18-20 gram. Jantung terdiri dari empat ruang dengan dinding atrium yang tipis dan dinding ventrikel yang lebih tebal. Peningkatan temperatur tubuh tidak mempengaruhi tekanan darah, sedangkan frekuensi jantung, *cardiac output* berkaitan dengan ukuran tubuhnya. Hewan ini memiliki karakter yang lebih aktif pada malam hari daripada siang hari.

Di antara spesies-spesies hewan lainnya, mencit yang paling banyak digunakan untuk tujuan penelitian medis (60-80%) karena murah dan mudah berkembang biak (Kusumawati, 2004).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan diempat tempat, yaitu di Laboratorium Botani Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang. Waktu yang dibutuhkan pada penelitian ini 6 bulan dan dilaksanakan mulai bulan April hingga Oktober 2009.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan pembuatan ekstraksi kulit jeruk adalah fraksi air *Citrus nobilis* Lour, NaOH, HCl, aquadest, Phosphate Buffer Saline (PBS), alkohol 70%, kertas *tissue* steril. Bahan yang digunakan untuk isolasi protein spermatozoa dan pemeriksaan gel agarosa adalah gel agarosa 1 %, HCl, NaOH, NaCl, Natrium Asetat, proteinase K, RNAase, isopropanol, NaOAc, TE, Tris Buffer EDTA (TBE) buffer, Ethidium Bromida (EtBr).

3.2.2. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi oven, pipet modifikasi, *petridish disposable* (nuclon), erlenmeyer, *sput disposable*, gunting,

pinset, gelas ukur, pipet pasteur (Germany), bunsen, mortil, blender, kain *flanel*, oven, miliphore 0.2 μm (whatman), mikropipet otomatis, sonde, *ependrof*, pipet mikro, *sentrifuge*, bak elektroforesis, *transilluminator*.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba mencit jantan digunakan berumur enam bulan dengan rerata berat badan 30 gram. (*Mus musculus*) sebanyak 40 ekor dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (P0), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok dikumpulkan dalam satu kandang. Tiap kelompok berisi 10 ekor mencit jantan yang dipilih secara acak dari populasi.

3.3.2. Pembuatan Fraksi Air *Citrus nobilis* Lour

Kulit buah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour) dijemur sampai kering, kemudian dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Serbuk direndam dengan *aquadest* lalu dilakukan penyaringan dengan kain *flanel* secara berulang hingga mendapatkan filtrat yang bening. Setelah itu residu diberi *aquadest* sebanyak 1,5 kali berat residu, kemudian lakukan pembasaan dengan menggunakan larutan NaOH 2N sampai didapatkan pH 11-11,5 dan didiamkan pada suhu kamar selama satu jam. Rendaman disaring menggunakan kain *flanel*.

Filtrat hasil penyaringan selanjutnya diasamkan dengan HCl 2N mencapai pH 4,2-4,5 kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu antara 40-45°C selama 12-24 jam. Fraksi air yang didapat dalam bentuk padat sehingga harus dibuat larutan solutio dahulu sebelum diberikan pada hewan coba. Cara pembuatan larutan solutio yaitu timbang fraksi air *Citrus nobilis* Lour sesuai dosis yang dibutuhkan lalu digerus menggunakan mortil sampai halus dan tambahkan *aquadest*. (Setiawan, 2006).

3.3.3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba

Hewan coba yang akan mendapatkan perlakuan pada percobaan adalah mencit jantan yang sudah dibagi menjadi 4 kelompok yaitu

P₀ : 10 ekor mencit jantan pada kelompok ini merupakan kontrol yaitu hanya diberi *aquadest*

P₁ : 10 ekor mencit jantan diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour *per-oral* dengan dosis 40 mg/kg bb

P₂ : 10 ekor mencit jantan diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour *per-oral* dengan dosis 60 mg/kg bb

P₃ : 10 ekor mencit jantan diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour *per-oral* dengan dosis 80 mg/kg bb

Pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour *per-oral* dilakukan selama 1 kali siklus spermatogenesis yaitu 35 hari. Pada hari ke 36 semua mencit jantan dari kelompok kontrol dan perlakuan dibedah, untuk

diambil sperma dibagian cauda epididimis yang kemudian akan disimpan untuk isolasi DNA dan dilanjutkan pemeriksaan elektroforesis.

3.3.4. Koleksi Spermatozoa Mencit

Mencit jantan dikorbankan secara dislokasio os cervicalis, kemudian mencit diterlentangkan pada tempat pembedahan dan dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70 % pada daerah yang akan dibedah. Selanjutnya dilakukan pembedahan berbentuk V pada abdomen *Mus musculus*. Kemudian dengan bantuan pinset diangkat bagian testis. Testis di bersihkan dari jaringan lemak kemudian cauda epididimis dipotong. Cuci dengan larutan NaCl fisiologi untuk membersihkan dari kotoran yang menempel pada cauda epididimis. Cauda epididimis dicacah untuk mengeluarkan spermatozoa. Ditambahkan PBS sebanyak 3ml dengan menggunakan pipet modifikasi untuk diambil spermatozoa, setelah itu dilakukan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan yang digunakan sebagai sampel adalah endapan yang mengandung spermatozoa.

3.3.5. Isolasi DNA Spermatozoa

Ambil 1ml sampel spermatozoa lalu tambahkan 1 ml buffer lisis homogenasi kemudian dimasukkan homogenate kedalam ependrof. Ditambahkan 4µl proteinase K kemudian dicampur supaya merata.

Dilakukan inkubasi pada suhu 55 °C selama 1 jam. Setelah itu dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit. Kemudian ambil supernatant, dipisahkan supernatant dari filtrat. Tambahkan 4µl RNAase (yang sudah diencerkan), kemudian dicampur supaya merata dan dilakukan inkubasi 10 menit 55 °C. Ditambahkan 400 µl isopropanol dan 100 µl NaOAc 3M. Kemudian disimpan pada suhu -20 °C selama 30 menit, lanjutkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm 10 menit. Pelet yang dihasilkan kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian ditambahkan TE 20µl.

3.3.6. Elektroforesis Gel Agarosa

Membuat gel agarosa 1 %. Kemudian ditambahkan 0,4 gram agarosa dilarutkan Be Buffer 1 x 40 ml. Selanjutnya dipanaskan sampai warnanya bening dan encer dengan suhu 90 °C. Diangkat, kemudian diamkan sampai suhu turun menjadi 10 °C. Selanjutnya larutan dituangkan pada bak elektroforesis dan diamkan hingga membentuk gel. Kemudian dimasukkan sampel DNA hasil isolasi dalam sumuran (sampel ditambahkan loading dye dengan perbandingan 1 : 1). Lakukan running 100 V selama 60 menit. Selanjutnya hasil running direndam dalam EtBr selama 15 menit sebagai zat pewarna DNA, setelah itu dapat diinterpretasi dengan menggunakan transilluminator.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, yaitu peneliti memberi suatu perlakuan terhadap mencit sebagai hewan coba. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan semua perlakuan dianggap homogen. Perlakuan dapat diatur secara random oleh peneliti (Kusriningrum,2008).

3.5. Peubah yang Diamati

Setelah dilakukan elektroforesis gel agarosa didapatkan gambaran laju migrasi profil band DNA spermatozoa *mus musculus* untuk melihat perbandingan jumlah pasangan basa DNA total antara kontrol dan perlakuan.

3.5.1. Jenis Peubah

Peubah bebas meliputi fraksi air *Citrus nobilis* Lour, sedangkan peubah tidak bebas meliputi profil band DNA spermatozoa *Mus musculus*, dan peubah terkendali meliputi alat, bahan dan hewan coba

3.5.2. Definisi Operasional

Fraksi air *Citrus nobilis* Lour :

adalah hasil ekstraksi kulit jeruk keprok yang diproses lebih lanjut dengan pengasaman dan pembasaan dan dikering dengan menggunakan oven sehingga diperoleh fraksi air *Citrus nobilis* Lour dalam bentuk padat

Profil band DNA :

adalah pita DNA yang muncul pada gel agarosa setelah dilakukan elektroforesis gel agarosa

DNA total :

Adalah DNA keseluruhan yang terdiri dari DNA inti dan DNA mitokondria

Mencit Perlakuan :

adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan dengan fraksi air *Citrus nobilis* Lour dengan dosis masing-masing 40 mg/kg bb, 60 mg/kg bb dan 80 mg/kg bb selama 35 hari.

Mencit Kontrol :

Adalah kelompok mencit yang diberi perlakuan dengan *aquadest* selama 35 hari

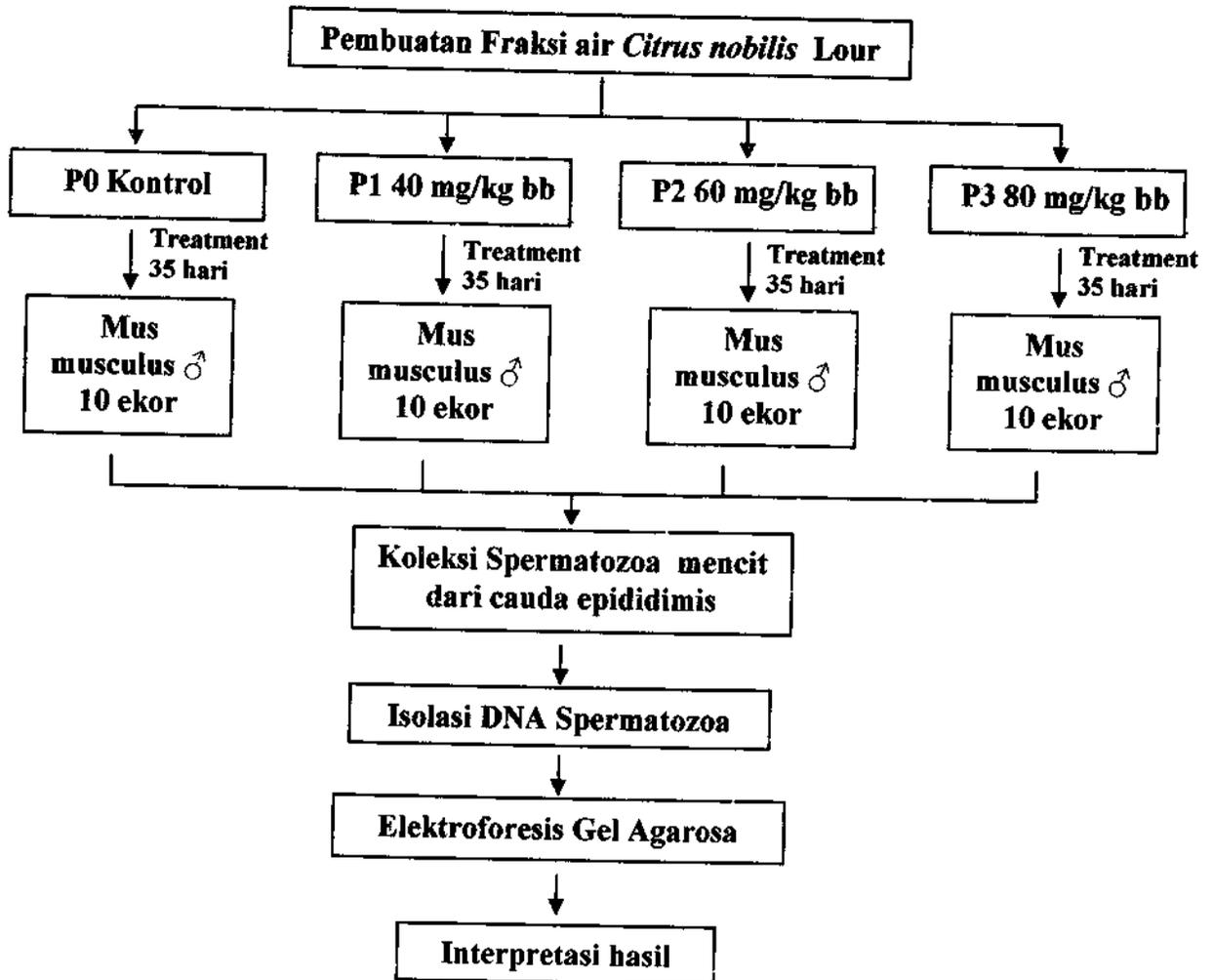
Spermatozoa mencit :

adalah spermatozoa yang diambil dari cauda epididimis dengan jalan memotong-motong cauda epididimis dalam medium PBS, kemudian dikoleksi spermatozoanya.

3.6. Analisa Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara membandingkan profil band DNA antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang telah diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour .Data yang diperoleh dalam bentuk gambaran profil band DNA spermatozoa yang dianalisis secara diskriptif.

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4. HASIL PENELITIAN

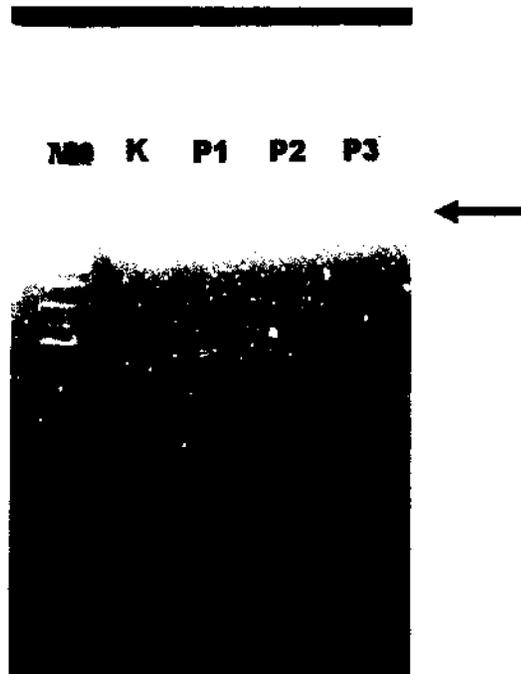
4.1. Fraksi air *Citrus nobilis* Lour

Untuk pembuatan fraksi air *Citrus nobilis* Lour bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour). Dari 13 kg buah jeruk keprok dapat diperoleh kulit buah sebanyak 1,2 kg. Kemudian kulit buah jeruk dibersihkan dengan air sehingga tidak ada kotoran yang menempel. Kulit buah jeruk dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, setelah kulit buah jeruk kering kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk dan didapatkan dalam bentuk serbuk sebanyak 600 gram.

Serbuk direndam (dimaserasi) dengan aquadest selama 24 jam lalu buang filtrat ulangi lagi hingga didapat filtrat berwarna jernih. Sisa serbuk yang tidak larut (residu) ditambah aquadest dengan perbandingan 1:1,5 lalu dibasakan menggunakan NaOH 2N hingga pH mencapai 11-11,5, diamkan pada suhu kamar selama satu jam. Rendaman kemudian disaring menggunakan kain flanel, filtrat diasamkan dengan penambahan larutan HCl 2N sampai diperoleh pH 4,2-4,5. Kemudian masukkan filtrat kedalam oven dengan suhu antara 40-45⁰C selama 12-24 jam. Hasil pembuatan fraksi air yang telah dilakukan *Citrus nobilis* Lour dihasilkan ekstrak kering seberat 40 gram .

4.2. Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil dari elektroforesis gel agarosa dapat dilihat Pada gambar 4.1 dibawah ini. Elektroforesis dilakukan untuk melihat jumlah pasangan basa DNA total yang terdapat pada spermatozoa mencit baik kontrol maupun yang sudah diberi perlakuan dengan fraksi air *Citrus nobilis* Lour .



Gambar 4.1. Visualisasi Band DNA Hasil Elektroforesis Gel Agarosa

Keterangan :

- M : Marker
- K : Kontrol
- P1 : Perlakuan 1 dengan dosis 40 mg/kg bb
- P2 : Perlakuan 2 dengan dosis 60 mg/kg bb
- P3 : Perlakuan 3 dengan dosis 80 mg/kg bb

Berdasarkan perhitungan dengan persamaan linier log Bp dan Rf marker, maka didapatkan jumlah pasangan basa kontrol, P1, P2 dan P3 seperti pada tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1. Perhitungan jumlah pasangan basa DNA total kontrol, P1, P2 dan P3

	A	B	Rf	Log BP	BP
Kontrol	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P1	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P2	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P3	21	128	0.16406	4.1179	13117.75

Keterangan :

A : Jarak pergerakan DNA marker dari tempat awal

B : Jarak pergerakan warna dari tempat awal

Rf : Perbandingan A : B

Log BP : Log dari jumlah pasangan basa

BP : Pasangan Basa (*base pair*)

Interpretasi dari gambar 4.1 dapat dilakukan dengan membandingkan laju migrasi profil band DNA total kontrol dan perlakuan terhadap marker untuk melihat jumlah pasangan basa DNA total. Profil band DNA kontrol terletak diatas marker 10.000 bp. Berdasarkan penghitungan, pada kontrol terdapat 13117.75 pasangan basa DNA total.

BAB 5

PEMBAHASAN

BUKTI

PERIBAHAS

BAB 5 PEMBAHASAN

Elektroforesis gel agarosa merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekular yang digunakan untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya dalam sebuah medan listrik. Elektroforesis dapat digunakan untuk mengetahui ukuran DNA dengan menggunakan DNA marker yang sudah diketahui ukurannya. Untuk mendeteksi potongan-potongan DNA berupa bands-DNA pada gel agarose digunakan pewarna yang mengandung fluoresen dengan konsentrasi rendah, seperti *intercalating agent* ethidium bromide (EtBr) (Fatchiyah, 2006).

Pita-pita (*band*) pada lajur-lajur (*lane*) yang berbeda pada gel akan tampak setelah proses pewarnaan; satu lajur merupakan arah pergerakan sampel dari "sumur" gel. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama (Nurlaelah, 2009).

Sebelum sampel DNA di *running* pada gel agarosa, harus ditentukan lebih dahulu berapa jumlah DNA dan *loading dye* yang akan dimasukkan ke dalam sumuran. *Loading dye* berfungsi memudahkan masuknya DNA ke dalam sumuran gel, menambah densitas gel agarosa, sebagai pewarna untuk memudahkan meletakkan contoh DNA kedalam sumur dan memudahkan

pergerakan DNA ke arah anoda dengan laju yang dapat diperkirakan (Nurlaelah, 2009).

Dari gambar 4.1 dapat dilihat profil band DNA kontrol dan perlakuan jika dibandingkan dengan marker maka akan dapat dilihat jumlah pasangan basa DNA total. Berdasarkan penghitungan, pada kontrol terdapat 13117.75 pasangan basa DNA total. Sedangkan P1, P2, P3, dibandingkan dengan kontrol, laju migrasi profil band DNA terletak sejajar. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah pasangan basa pada kelompok P1, P2, P3 memiliki jumlah yang sama dengan kelompok kontrol yaitu 13117.75 pasangan basa. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara jumlah pasangan basa DNA total spermatozoa dari kelompok perlakuan dengan kontrol.

Dari hasil penelitian tersebut diatas menunjukkan bahwa tidak adanya perbedaan profil band DNA antara kelompok kontrol dan perlakuan disebabkan pemberian *Citrus nobilis* Lour pada spermatozoa selama 35 hari tidak menyebabkan perubahan pada panjang urutan basa nukleotida yang diviasualisasikan pada gel agarosa profil band sama. Menurut Permana (2008) proses yang terjadi kemungkinan pemberian *Citrus nobilis* Lour mempengaruhi gen dasar asli (*wild tipe gen*) dalam sel, sehingga akan menyebabkan awal mutasi pada gen dasar asli. Pada awal mutasi ini, sistem repair yang ada dalam sel menjadi aktif untuk melakukan penggantian kerusakan basa nukleotida, memperbaiki dan melindungi basa nukleotida yang rusak, sehingga mutasi tidak terjadi dan tidak ada perubahan pada panjang urutan basa nukleotida. Tidak adanya perubahan urutan basa

nukleotida yang divisualisasikan pada gel agarosa dalam bentuk profil band DNA antara kelompok kontrol dan perlakuan adalah sama.

Namun tidak adanya perbedaan pada profil band DNA antara kelompok kontrol dan perlakuan mungkin diakibatkan waktu pemberian perlakuan *Citrus nobilis* Lour kurang lama, dosis *Citrus nobilis* Lour yang diberikan terlalu rendah dan juga pemberian perlakuan yang dilakukan pada pagi dan sore hari sehingga hasil yang didapatkan belum optimal, oleh karena itu menyebabkan tidak adanya perbedaan profil band DNA spermatozoa.

Waktu pemberian yang kurang lama dan dosis yang kurang tinggi dapat menyebabkan pasangan basa DNA cenderung tidak berubah dan tidak tampak adanya perubahan pada profil band spermatozoa mencit setelah pemberian *Citrus nobilis* Lour. Kalaupun ada perubahan tetapi bersifat reversibel.

Pemeriksaan elektroforesis dengan gel agarosa hanya mengamati perbedaan profil band DNA yang tervisualisasi pada gel agarosa setelah diwarnai dengan Ethidium Bromida. Tahap ini merupakan pengujian awal untuk mengetahui adanya perbedaan profil band DNA. Adanya perbedaan profil band DNA akan indikasi terjadinya mutasi, untuk itu perlu dilakukan sequencing DNA dan pemeriksaan lebih lanjut dengan PCR (Sumitro dkk., 2009; Yepyhardi, 2009). Adanya perbedaan profil band DNA pada visualisasi gel agarosa mengindikasikan bahwa panjang pasangan basa nukleotida tidak sama, hal ini disebabkan ada basa nukleotida yang hilang. Teknik DNA sequencing dengan menggunakan amplifikasi gel agarosa untuk urutan

pasangan basa nukletida (Yepyhardi, 2009; Zaenuri, 2009; Promono dkk., 2009).

Elektroforesis gel agarosa merupakan teknik pemisahan DNA total berdasarkan perbedaan profil band DNA dalam suatu medan listrik. Kecepatan DNA bergerak dalam medan listrik tergantung ukuran molekul DNA, konformasi DNA, konsentrasi media gel yang dilalui DNA, pewarnaan DNA, komposisi buffer elektroforesis dan arus listrik yang diberikan. Semakin kecil ukurannya, DNA akan bermigrasi semakin cepat. Semakin rapat media yang digunakan, semakin lambat DNA bermigrasi. Dan semakin besar arus yang digunakan akan bermigrasi semakin cepat. Oleh karena itu posisi DNA yang separasi pada gel dapat dideteksi dengan autoradiograf, ataupun divisualisasikan dengan media UV-transilluminator (Fatchiyah, 2006).

Menurut Kimball (2004) menyatakan bahwa konformasi DNA juga mempengaruhi profil band DNA pada media gel agarosa. Perbedaan profil band DNA juga bisa disebabkan konsentrasi gel agarosa, kekuatan arus listrik dan konformasi DNA. Pada penelitian ini yang digunakan adalah DNA total, konsentrasi gel, pewarna, buffer tris dan arus listrik yang digunakan adalah sama. Oleh karena itu tidak terdapatnya perbedaan profil band DNA antara kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) menunjukkan bahwa pemberian pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour pada mencit jantan selama 35 hari tidak menyebabkan perubahan pada DNA spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian pemanfaatan fraksi air *Citrus nobilis* Lour sebagai salah satu alternatif bahan obat kontrasepsi pria bisa dinyatakan aman

dari sudut pengujian mutagenik. Untuk mengetahui susunan basa nukleotida tidak terjadi perubahan dalam arti tidak terjadi penambahan dan pengurangan pasangan basa nukleotida perlu dilakukan penelitian lebih lanjut melalui uji sequencing (Fatchiyah, 2006; Pramono dkk, 2009).

Adanya penghapusan atau penambahan pasangan basa DNA juga akan berpengaruh terhadap jumlah pasangan basa DNA total. Pada hasil elektroforesis, dapat dilihat bahwa tidak ada perubahan yang signifikan antara kontrol dan perlakuan. Oleh karena itu dapat diasumsikan bahwa pemberian fraksi air Citrus nobilis Lour tidak memberikan efek yang signifikan terhadap jumlah pasangan basa DNA total sehingga diharapkan aman untuk digunakan sebagai bahan alternatif kontrasepsi.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan gambaran profil band DNA spermatozoa *Mus musculus* antara kelompok kontrol dan perlakuan akibat pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan penambahan dosis fraksi air *Citrus nobilis* Lour agar dapat diketahui ukuran dosis yang dapat menyebabkan mutasi gen.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu perlakuan yang lebih lama untuk dapat mengetahui lamanya waktu yang di butuhkan agar dapat menimbulkan kondisi irreversibel pada pasangan basa DNA total spermatozoa mencit.
3. Untuk mengetahui urutan basa nukleotida akibat pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode *sequencing* DNA.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui adanya mutasi gen dengan metode PCR untuk membuktikan fraksi air *Citrus nobilis* Lour tidak menyebabkan mutagenik, dan dapat digunakan sebagai alternatif bahan obat kontrasepsi.

RINGKASAN

RINGKASAN

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan tumbuh – tumbuhan. Salah satunya adalah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour). Kulit buah jeruk keprok (*Citrus nobilis* Lour) mengandung berbagai komponen yaitu vitamin A, vitamin B, vitamin C, limonene, citral dan methyl antranilate.

Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan *inhibitor* hialuronidase. Kandungan hesperidin dalam kulit buah jeruk mampu menurunkan aktivitas enzim hialuronidase sehingga kemampuan spermatozoa mendispersi *cumulus oophorus* menurun hal ini akan menurunkan terjadinya proses fertilisasi.

Sebagai alternatif bahan kontrasepsi, kulit jeruk harus aman penggunaannya, tidak boleh menimbulkan efek samping bagi pemakainya yaitu tidak boleh toksik terhadap organ tubuh, tidak menimbulkan efek teratogenik dan tidak boleh menyebabkan mutagenik. Efek mutagenik dapat menyebabkan kelainan DNA jika bahan obat kontrasepsi dikonsumsi secara terus – menerus.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil band DNA spermatozoa *Mus musculus* yang telah diberi fraksi air *Citrus nobilis* Lour . Pada penelitian ini digunakan fraksi air *Citrus nobilis* Lour dosis 40 mg/kg BB, 60 mg/kg BB, 80 mg/kg BB dan kontrol dengan pemberian *aquadest* secara per oral setiap hari sekali sebanyak 1 ml/ekor selama satu kali siklus spermatogenesis yaitu 35 hari. Pada hari ke-36 dilakukan pembedahan untuk

mengambil cauda epididimis yang didalamnya mengandung spermatozoa. Kemudian koleksi spermatozoa dari cauda epididimis *Mus musculus* untuk dilakukan isolasi DNA agar dapat diperiksa dengan elektroforesis gel agarosa

Berdasarkan penghitungan, pada kontrol terdapat 13117.75 pasangan basa DNA total. Sedangkan P1, P2, P3, dibandingkan dengan kontrol, profil band DNA terletak sejajar. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah pasangan basa pada kelompok P1, P2, P3 memiliki jumlah yang sama dengan kelompok kontrol yaitu 13117.75 pasangan basa. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara profil band DNA maupun jumlah pasangan basa DNA total spermatozoa dari kelompok perlakuan dengan kontrol.

Oleh karena itu dapat diasumsikan bahwa pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour tidak memberikan efek yang signifikan terhadap jumlah pasangan basa DNA total sehingga diharapkan aman untuk digunakan sebagai alternatif bahan kontrasepsi.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR ISI

DAFTAR PUSTAKA

- Ashari, S., 1995. Hortikultura Aspek Budidaya. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Hal. 310-312
- Astirin, O.P. dan Muthmainah. 2002. *Struktur Histologis Ovarium Tikus (Rattus norvegicus) gravid Setelah pemberian Ekstrak Momordica charantia L.* Jurnal Pharmacon. Jakarta. 1(2). 26-30. Balkan, J. 2001. *Aroma terapi.* Dahara Prize. Semarang.
- Berkarda, B., H. Koyuncu., G. Soybir and F. Baykut. 1998. Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. *Research in Experimental Medicine* 198 : 93-99
- Boyer, F.R., 1993. *Modern Experimental Biochemistry.* 2nd Ed, California : The Benjamin / cummings Publishing Company, pp.115-143
- Curry, M.R., and P.F. Watson. 1995. *Sperm Structure and Function.* In Grudzinskas JG and YovichJI. Eds , *Gametes the spermatozoon .* 1st ed, Cambridge University press , pp.45-69
- Dewanti W. 2005. Profil Band DNA Spermatozoa Epididimis Mencit Setelah Pemberian Fasa Air Justicia gendarussa Burm f. Dengan Metode Gel Agarosa. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Erlich,H.A. 1989. *PCR Technology : Principles and Aplications for DNA Amplification.* Stockton Press. New York.
- Fatchiyah. 2006. Gel Elektroforesis. Lab. Sentral Biologi Molekuler dan Seluler Departemen Biologi Universitas Brawijaya.
- Fransworth, NR., DP. Waller. 1982. Curent status of plant products reported to inhibit sperm. In : *Research frontiers in fertility Regulation.* pp 1-16.
- Ganong, W.F. 2002. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.* Edisi 17. Alih Bahasa: H.M. Djanuari Widjayakusuma. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. 437-439.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, D., and Singla, A. K. 2001. *Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin.* *Phytotherapy Research*, XV : 655-669
- Gilbert, SF, 1988. *Developmental Biology,* 2nd Ed, Sunderland. Masschusetts; Sinauer Association Inc, pp 313-330.

- 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. Pp 681-715
- Gyorgy and Szent, A, 2000. Hesperidin From citrus spp. <http://www.Symmcorp.com/info/hesperidin/htm> [8 September 2009]
- Hafez, E. S. E. 1993. *Reproduction in Farm Animals* 6th. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia. pp 3-8, 165-186.
- Hafez, E.S.E, 2000. Preservation and Cryopreservation of Gamet Embryo. In. E.S.E Hafez (ed). *Reproduction in Farm Animal*. 7th Edition. Lea and Febringer. Philadelphia.
- Hardijanto, T. Sarjito, T. Hernawati, S. Susilowati., dan T.W. Suprayogi. 2008. *Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjoprannjoto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya. Surabaya. Hal 19-30
- Hill, J.W., D.M. Feigl, and S.J. Baum, 1993. *An Introductory to General, Organic, and Biological Chemistry*, New Jersey : Prentice-Hall, Inc, p.629-631
- Holme, D.J., and H. Peck, 1994. *Analytical Biochemistry*. Second edition, Singapore : Longman Singapore Publishers, p.461-471
- Ismudiono., H. Anwar., P. Sianto., S.P. Madyawati., A. Samik., E. Safitri., 2007. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Surabaya. Hal 79-82
- Kusriningrum, RS. 2008. *Buku Ajar Perancangan Percobaan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 30-32.
- Keeton, W.T. 1980. *Biology Science*. 2nd edition, Georgia O'keffe
- Kimball, J.W. 2004. *Biology : Nucleotide, The double helix, Base Pairing* <Http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages> [15 Juli 2009]
- Kusumawati, D. 2004. *Buku Ajar Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- Li.,T,S,C, 2002. *Chines e and Related North American Herbs, Phytoparmacology and Therapeutics Value*. Bca Raton: CRC Press

- Lincoln, G. A., H. M. Fraser and M. P. Abbot. 1986. Blockade of pulsatile LH, FSH and testosterone secretion in rams by constant infusion of an LHRH agonist. *J. Reprod. Fert.* 77.
- Manner, H.I., R.S. Bucker., V.E. Smith., D. Ward and C.R. Elevitch. 2006. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. //http.www.traditionaltree.org [01 September 2009]
- Mann, T and Lutwak – Mann, C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Martin, D.W., P.A. Mayes, and V.W. Rodwell, 1981. *Harper's Review of Biochemistry*. California : Lange Medical Publication
- Mentari .P. I. 2005. Hambatan Apigenin Dan Hesperidin Terhadap Aktivitas Hialuronidase EC 3.2.1.35 *in vitro*. [Skripsi] Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
- Morris, R., 2004. *Citrus spp.* <http://www.pfaf.org/database/plants.php?citrus+spp>. 4 Desember 2005
- Nalbandov. A.V. 1990. Physiology of Mammals and Birds. Dalam: Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Penerjemah: Sunaryo Keman. Jakarta: Universitas Indonesia Press., h. 41-55
- Nurlaelah. I. 2009. Elektroforesis Gel Agarosa. Pengantar Biologi Sel Molekuler Program S2 Biologi. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Sudirman. Purwokerto
- Permana,S. 2008. Mutations and Repair. Penerbit Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,Universitas Brawijaya, Malang
- Poernomo, B., M. Mafruchati, Widjiati, E. M. Luqman , E. D. Masithah. 2005. Diktat Ilmu Mudigah. Lab Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Prajogo, B.E.W. 2002. Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun Justicia gendarussa Burm.F. : Penelitian eksperimental Pencegahan Penetrasi Spermatozoa Mencit dalam proses fertilisasi In vitro. Desertasi program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya
- Prajogo, B.E.W., Widjiati, Hamdani dan Aucky, H., 1997. Hambatan Hesperidin Terhadap Penetrasi Spermatozoa Mencit Dalam Proses Fertilisasi *In Vitro*, Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX, Yogyakarta

- Pramono.H, H.Soesanto, N.D.SasongkoA.A.Wanto dan D.J.Wahyu. 2009. Sekuensing DNA di dalam : Biologi Molekuler. Penerbit Fakultas Biologi Unsoed
- Robertson, H., 2004. *Citrus* (Orange, Lemon, Lime, Grapefruit, Naartjie genus). <http://www.museums.org.7a/bio/plants/rutaceae/citrus.htm>. [1 September 2009]
- Setiawan D.A. 2006. Efek ekstrak kulit buah *Citrus nobilis* Lour terhadap angka fertilitas. [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Sumitro, S.B, S. Rahayu, Fatchiyah, S. Widyarti dan E.L. Arummingtyas. 2009. Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein Dan DNA. Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang
- Smith, J,B, dan S. Mankoewidjoyo. 1998. Pemeliharaan, Pembiakan, dan penggunaan Hewan Coba di Daerah Tropis. Jakarta: Universitas Indonesia., hal 10-11
- Whittingham, D.G., and M.J., wood. 1992. *In: Henry, L., Foster. Reproductive Physiology dalam The Mouse in Biomedical Research*, vol. III, Boston: Academic Press.Inc, p.140
- Yatim Wildan. 1994. Reproduksi dan Embriologi untuk Mahasiswa Biologi dan Kedokteran. Tarsito. Bandung
- Yepyhardi. 2009. Mengeanal Teknik DNA Sequencing. Science Biotech. Hal : 1-10
- Zaenuri.S.N. 2009. Biologi Molekuler Gen, di dalam: Genetika Dasar. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Hal : 1-16
- Zawistowski, Stephen L. 2002. *Animal Contraception*. ASPCA Animal Watch. New York.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan dosis

Dari penelitian sebelumnya pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour dosis terkecil yaitu 100 mg/kg BB mencit dapat memberikan efek hambatan fungsi penetrasi spermatozoa yang mutlak. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi dosis dibawah dosis tersebut untuk mendapatkan dosis optimum yaitu antara 40 mg/kg – 80 mg/kg dan akan dibuat tiga variasi dosis. Penentuan dosis menggunakan rumus penentuan interval dosis yaitu $F = \sqrt[n]{I}$

Keterangan :

F = Faktor pengali

n = (jumlah dosis dalam deretan) -1

I = dosis terbesar

dosis terkecil

Maka perhitungan dosisnya sebagai berikut :

$$\begin{aligned} F &= \sqrt[2]{80/40} = \sqrt[2]{2} = \frac{1}{2} \log 2 \\ &= \frac{1}{2} \cdot 0,3 \\ &= 0,15 \rightarrow \text{anti log} = 1,41 \end{aligned}$$

Sehingga dosis yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

Dosis 1 : 40 mg/kg BB

Dosis 2 : 40 mg/kg x 1,41 = 56,50 = 60 mg/kg BB

Dosis 3 : 56,50 mg/kg x 1,41 = 79,66 = 80 mg/kg BB

Lampiran 2. Perhitungan jumlah pasangan basa

A	B	Rf	Log BP	BP
25	128	0.19531	4	10000
28	128	0.21875	3.9031	8000
31	128	0.24219	3.7782	6000
33	128	0.25781	3.699	5000
36	128	0.28125	3.6021	4000
38	128	0.29688	3.5441	3500
40	128	0.3125	3.4771	3000
42	128	0.32813	3.3979	2500
45	128	0.35156	3.301	2000
49	128	0.38281	3.1761	1500
52	128	0.40625	3.0792	1200
55	128	0.42969	3	1000

Keterangan:

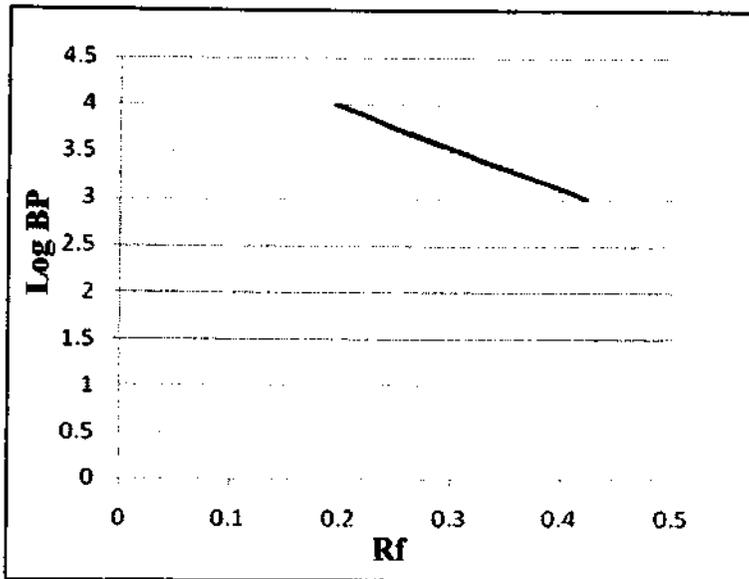
A : Jarak pergerakan DNA marker dari tempat awal

B : Jarak pergerakan warna dari tempat awal

Rf : Perbandingan A : B

Log BP : Log dari jumlah pasangan basa

BP : Pasangan Basa (*base pair*)



Grafik persamaan linier Rf dan Log BP

Dari grafik di atas, maka didapat persamaan linier :

$$y = -4.298x + 4.823$$

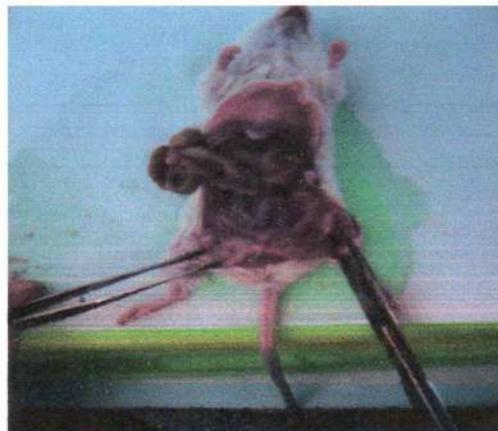
Maka dapat dihitung Band DNA Kontrol, P1, P2 dan P3 sebagai berikut:

	A	B	Rf	Log BP	BP
Kontrol	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P1	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P2	21	128	0.16406	4.1179	13117.75
P3	21	128	0.16406	4.1179	13117.75

Lampiran 3. Perlakuan *Citrus nobilis* Lour



Gambar : Cara pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour secara per-oral menggunakan sonde pada mencit jantan



Gambar : Pembedahan untuk mengambil cauda epididimis yang digunakan untuk isolasi DNA

Lampiran 4. Proses Isolasi DNA Spermatozoa



Setrifuse



penambahan buffer lisis



Penambahan proteinase K



inkubator

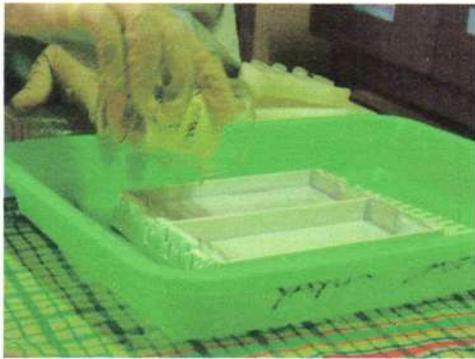


Penambahan RNAase



penambahan isopropanol dan NaOAc

Lampiran 5. Proses Elektroforesis Gel Agarosa



Penuangan gel



pemasangan sumuran



Pemindahan gel ke dalam chamber



penuangan TBE buffer



Penambahan sampel dengan loading dye



memasukkan sampel kedalam sumuran

