

SKRIPSI

**PENGARUH HESPERITIN TERHADAP PERKEMBANGAN
EMBRIO MENCIT PADA KULTUR
*IN VITRO***



Oleh

KEN ARIEF TARMUZI
NGANJUK - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

Yang Maha Pemurah
Yang telah mengajarkan Al Qur'an
Yang menciptakan manusia
Mengajarnya ilmu bahasa
Matahari dan bulan beredar menurut perhitungan
Dan tumbuh-tumbuhan dan pohon-pohonan semuanya tunduk kepada-Nya
(Al Rahman 55: 1-6)

*Special to :
My Mother, Father
Sister and Brother*

**PENGARUH HESPERITIN TERHADAP PERKEMBANGAN
EMBRIO MENCIT PADA KULTUR
*IN VITRO***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

KEN ARIEF TARMUZI

NIM 069512244

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Widjiati, M.Si., Drh.

NIP 131877882

Pembimbing Pertama



Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, M.S., Drh.

NIP 130350739

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui

Panitia Penguji,

Dr. Bambang Purnomo S., M.S., Drh.

NIP 130701131

Ketua

Chairul Anwar, M.S., Drh.

NIP 131453179

Sekretaris

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

NIP 131837006

Anggota

Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, M.S., Drh.

NIP 130350739

Anggota

Widjiati, M.Si., Drh.

NIP 131877882

Anggota

Surabaya,

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Departemen Pendidikan Kedokteran,



Fadli Sidiqo, M.S., Drh.

NIP 130687297

**PENGARUH HESPERITIN TERHADAP PERKEMBANGAN
EMBRIO MENCIT PADA KULTUR
*IN VITRO***

Ken Arief Tarmuzi

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan terhadap perkembangan embrio dari tahap satu sel sampai blastula pada kultur *in vitro*. Hesperitin merupakan *aglikon* dari hesperidin termasuk senyawa flavonoid yang mempunyai aktifitas sebagai inhibitor enzim hyaluronidase pada proses fertilisasi. Sebanyak 40 ekor mencit jantan strain BALB C berumur 3-4 bulan, selama 52 hari diberi larutan hesperitin. Dosis pemberian hesperitin dibagi dalam tiga kelompok, 31 mg/kg BB, 62 mg/kg BB, 124 mg/kg BB dan satu kelompok tanpa diberi hesperitin sebagai kontrol. Setiap kelompok perlakuan dan kontrol terdiri dari 10 mencit jantan yang diambil spermanya dari kauda epididimis untuk memfertilisasi masing-masing satu sel telur yang matang pada medium fertilisasi *in vitro*. Sel telur yang berhasil difertilisasi dikultur lebih lanjut, pengamatan dilakukan setiap 24 jam sampai embrio mencapai tahap blastula. Data diperoleh dengan menghitung jumlah embrio setiap tahap perkembangan dan dianalisis dengan Fisher Exact Test. Hasil penelitian menunjukkan bahwa embrio yang difertilisasi oleh sperma dari mencit jantan yang diberi hesperitin mengalami hambatan pertumbuhan dari satu menjadi dua sel. Tingkat perkembangan sangat rendah yaitu 11,1% pada dosis I, 33,3% dosis II dan 10% pada dosis III, berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$) yang mencapai 100%. Pada perkembangan selanjutnya embrio dari kelompok perlakuan tidak berkembang menjadi empat sel, sedang pada kontrol embrio yang mencapai tahap empat sel masih tinggi yaitu 80% dan morula 50%. Disimpulkan bahwa pemberian hesperitin dengan dosis 31, 62 dan 124 mg/kg BB menghambat perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*. Embrio tidak bisa berkembang lebih lanjut, sehingga tingkat perkembangan embrio rendah.

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur alhamdulillah kepada Allah SWT, atas berkat dan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **Pengaruh Hesperitin Terhadap Perkembangan Embrio Mencit Pada Kultur *In Vitro*** dengan baik.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Dr. Ismudiono, MS., drh, serta kepada Widjiati, M.Si., drh. selaku pembimbing pertama dan Prof. Dr. H. Rochiman S., M.S., drh. atas saran dan bimbingannya mulai dari awal penelitian sampai akhir penulisan skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang tulus penulis sampaikan kepada Drs. Bambang Prajogo E.W., Apt., M.S. dan Ir. Susi Amilah serta kepada pegawai Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, yang telah memberikan fasilitas dan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian.

Kepada Ayah, Ibu, Kakak dan Adik tercinta atas dorongan semangat dan doa restunya penulis sampaikan terima kasih yang tak terhingga. Kepada Yayasan Pendidikan Shiddiqiyah Losari, Ploso, Jombang; warga jama'ah Kautsaran Undaan Wetan Surabaya beserta para pengasuhnya (P. Mulyadi dan Mas Rudi Wardoyo); Keluarga Ib. Hj Iskandar (Yang-Ti) dan Bp. Heru

Gunawan; rekan-rekan Ex-S70 (Zulfah, Fitri, Anis, Dyah dan Tyta), Koko, Bobo, Aan, Joko, Andre, Rahmat, Supri, Wawan, Mas Dodo, Mas Anton, Mas Ramli, Mas Doni, Mufid; rekan-rekan Ko-Asistensi (Mb. Ana, Agung, IU, Suprap, Bisri, Asri, Vira, Layli dan Sobirin); serta rekan-rekan seluruh angkatan '95 atas sumbangan saran dan dukungannya penulis sampaikan terima kasih.

Penulis menyadari bahwa masih ada kekurangan pada penulisan skripsi ini, dan mengharapkan adanya kritik dan saran. Akhirnya penulis hanya dapat mendoakan semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis.

Surabaya, Januari 2002

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|-----------|
| DAFTAR TABEL | vi |
| DAFTAR GAMBAR..... | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| BAB I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang Penelitian..... | 1 |
| 1.2. Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Landasan teori..... | 4 |
| 1.4. Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.5. Manfaat Penelitian | 5 |
| 1.6. Hipotesis..... | 5 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 2.1. Tinjauan tentang Hesperidin dan Hesperitin..... | 6 |
| 2.2. Fertilisasi..... | 7 |
| 2.3. Fertilisasi <i>In Vitro</i> | 9 |
| 2.4. Perkembangan Embrio..... | 11 |
| 2.5. Medium Kultur <i>In Vitro</i> | 12 |
| BAB III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN..... | 15 |
| 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian..... | 15 |
| 3.2. Bahan dan Materi Penelitian..... | 15 |
| 3.3. Metode Penelitian | 17 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3.4. Rancangan Penelitian..... | 21 |
| 3.5. Peubah yang Diamati..... | 21 |
| 3.6. Analisis Data..... | 22 |
| BAB IV. HASIL PENELITIAN..... | 23 |
| 4.1. Fertilisasi..... | 23 |
| 4.2. Kultur Embrio..... | 24 |
| BAB V. PEMBAHASAN..... | 26 |
| 5.1. Fertilisasi..... | 26 |
| 5.2. Kultur Embrio..... | 27 |
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 34 |
| 6.1. Kesimpulan..... | 34 |
| 6.2. Saran..... | 34 |
| RINGKASAN..... | 35 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 37 |
| LAMPIRAN..... | 41 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Rumus senyawa hesperidin (a) dan senyawa hesperitin (b)..... | 7 |
| 2. Inkubator CO ₂ | 16 |
| 3. Mikroskop inverted | 16 |
| 4. Pemberian hesperitin per oral..... | 16 |
| 5. Uterus dan tuba falopii mencit | 18 |
| 6. Kantung fertilisasi | 18 |
| 7. Sel telur mencit..... | 18 |
| 8. Testis mencit..... | 20 |
| 9. Spermatozoa mencit | 20 |
| 10. Fertilisasi <i>in vitro</i> | 20 |
| 11. Tahap-tahap perkembangan embrio mencit..... | 25 |
| 12. Grafik perkembangan embrio..... | 28 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|---------|
| 1. Jenis-jenis Medium yang Digunakan | 42 |
| 2. Perhitungan Dosis Hesperitin | 43 |
| 3. Perhitungan statistik | 45 |

BAB I

PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Kepadatan penduduk dewasa ini merupakan masalah yang cukup besar bagi suatu negara dan sebagai akibat dari jumlah penduduk yang cukup besar, salah satu diantaranya akan menyangkut kebutuhan ekonomi dan kesejahteraan. Dewasa ini, pemerintah Indonesia telah berhasil menekan laju pertumbuhan penduduk melalui program Keluarga Berencana (KB).

Menurut data laporan dari Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional bahwa pada tahun 1998 di Indonesia terdapat 36 juta pasangan usia subur. Dari jumlah tersebut 26 juta pasangan pernah menggunakan kontrasepsi dan sebagian besar adalah wanita sebagai akseptor KB, sedangkan pihak suami hanya sedikit partisipasinya. Hal ini mungkin karena alat dan bahan kontrasepsi pria tidak banyak jenisnya seperti pada wanita, sehingga alternatif pilihan belum lengkap. Untuk itu telah dilakukan penelitian dalam rangka mencari alat dan bahan kontrasepsi pria yang ideal, antara lain mudah digunakan, murah, dapat diterima masyarakat, bersifat reversibel, tidak mempunyai pengaruh hormonal dan tidak toksik.

Hesperidin merupakan senyawa flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan-bahan inhibitor enzim hyaluronidase. Pada tahun 1948–1954

banyak laporan tentang aktifitas hesperidin pada pemberian oral dan intra peritoneal yang dapat mencegah terjadinya fertilisasi baik pada hewan maupun manusia (Zaneveld and Polakoski, 1976).

Tahun 1997 dilakukan suatu penelitian tentang aktifitas antifertilitas yang menggunakan hesperidin, hasil yang diperoleh pada kelompok perlakuan yaitu tidak terjadi fertilisasi dan sel-sel kumulus yang masih utuh. Hal ini membuktikan bahwa hesperidin dapat sebagai inhibitor enzim hyaluronidase yang spesifik bekerja pada kumulus ooforus (Prajogo dkk., 1997^b).

Apabila hesperidin dihidrolisa akan menghasilkan hesperitin (*metil eriodiktiol*), *ramnosa* dan *glukosa* (Trease and Evans, 1985). Hal ini sesuai dengan proses metabolisme dalam tubuh, dimana pemberian hesperidin dalam tubuh akan terhidrolisa menjadi *aglikon* (senyawa tanpa unsur gula) (Weintraub *et al.*, 1995) yaitu hesperitin. Diharapkan yang mempunyai aktifitas inhibitor enzim hyaluronidase adalah bentuk *aglikon* dari hesperidin yaitu hesperitin, sehingga diadakan penelitian tentang aktifitas hesperitin terhadap antifertilitas (Amilah, 2000).

Sebelum suatu obat digunakan dan diuji secara klinis, perlu dilakukan uji subklinis pada hewan coba. Hewan coba yang sesuai dengan penelitian obat antifertilitas adalah mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1986), karena penelitian antifertilitas dibutuhkan jumlah hewan coba yang cukup banyak. Mencit sebagai hewan coba mempunyai keuntungan antara lain, daur estrusnya

teratur dan dapat dideteksi, periode kebuntingan relatif singkat (19-21 hari) dan mempunyai anak banyak (6-15 ekor).

Obat yang tergolong kontrasepsi kadang memiliki aspek klinis yang luas dan biasanya berpengaruh pada jaringan lain selain organ reproduksi (Siti, 1995). Oleh karena itu pada pemakaian yang tidak tepat mungkin tidak akan mampu menghambat terjadinya fertilisasi. Jika obat tersebut tidak mampu menghambat terjadinya proses fertilisasi, dikhawatirkan akan berpengaruh pada perkembangan embrio berikutnya karena adanya residu dari hesperitin. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan terhadap perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*.

1.2. Perumusan Masalah

Alat dan bahan kontrasepsi pria tidak banyak jenisnya seperti pada wanita, sehingga alternatif pilihan belum lengkap. Selain itu, selama ini alat kontrasepsi banyak yang menggunakan hormon atau secara hormonal, yang mempunyai efek samping pada si pemakai yaitu mengganggu fungsi hormonal sistem reproduksi. Untuk itu dituntut usaha alternatif mencari alat dan bahan kontrasepsi yang tidak bersifat hormonal, misalnya yang bersifat enzimatis sehingga efek samping dapat ditekan.

Salah satu pengembangan alat kontrasepsi pria adalah mencari bahan yang berfungsi sebagai inhibitor enzim pada spermatozoa sehingga dapat menghambat

terjadinya fertilisasi, adapun enzim-enzim yang berperan adalah enzim hyaluronidase, Corona Penetrating Enzim (CPE) dan akrosin.

Hesperidin merupakan bahan inhibitor enzim hyaluronidase yang menghambat fertilisasi *in vitro* pada mencit (Prajogo dkk., 1997^b), dan hesperitin diharapkan paling berperan sebagai inhibitor enzim hyaluronidase.

Sebelum obat diaplikasikan ke manusia perlu diadakan uji subklinis pada hewan coba. Hewan coba yang sesuai untuk penelitian obat antifertilitas adalah mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1986). Pada pemakaian yang tidak tepat dikhawatirkan tidak menghambat fertilisasi tetapi akan mengganggu proses perkembangan embrio tahap berikutnya karena adanya residu dari hesperitin. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut “Apakah pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan dapat mengganggu perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*”.

1.3. Landasan Teori

Dari penelitian terdahulu terdapat beberapa hal penting yang dipakai sebagai acuan dalam penelitian ini. Pertama penelitian tentang pengaruh ekstraksi *Gandarussa vulgaris* Ness terhadap spermatogenesis mencit (Prajogo dkk., 1997^a), beberapa dosis tertentu tidak mampu menghambat fertilisasi bahkan sebaliknya menghambat perkembangan embrio pada kultur *in vitro* (Widjiati dkk., 1998). Yang kedua penelitian tentang pengaruh hesperidin terhadap penetrasi spermatozoa mencit dalam proses fertilisasi *in vitro* (Prajogo

dkk., 1997^b). Hesperidin berhasil menghambat fertilisasi dengan menghambat kerja enzim hyaluronidase dari spermatozoa.

Bentuk *aglikon* dari hesperidin yaitu hesperitin yang diduga yang paling berperan sebagai antifertilitas, ternyata pada pemberian per oral tidak mampu menghambat fertilisasi (Amilah, 2000). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan terhadap perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan terhadap perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh hesperitin terhadap perkembangan embrio mencit.

1.6. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut: “Pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan dapat menghambat perkembangan embrio mencit”.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

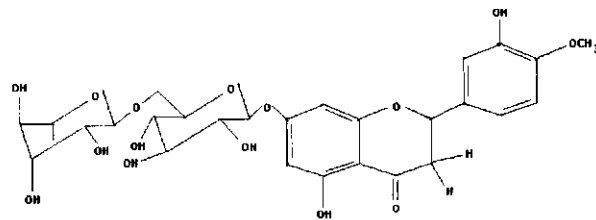
2.1. Tinjauan Tentang Hesperidin dan Hesperitin

Hesperidin merupakan senyawa flavonoid yang merupakan senyawa polifenol, adalah termasuk bahan-bahan inhibitor enzim hyaluronidase. Pada tahun 1948 sampai tahun 1954 banyak laporan tentang aktifitas hesperidin pada pemberian per oral dan intra peritoneal dapat mencegah terjadinya fertilisasi baik pada hewan maupun manusia. Namun setelah itu tidak diketahui kelanjutan dari penelitian tersebut (Zaneveld and Polakoski, 1976).

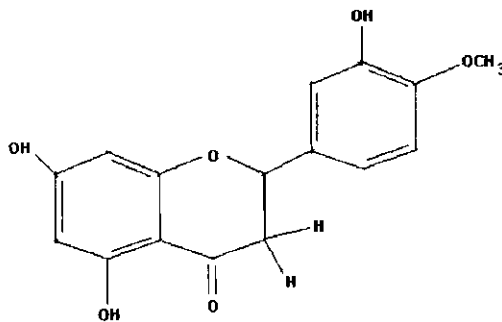
Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru, sebagian zat warna kuning yang dapat ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dua cincin benzena (C₆) terikat pada suatu rantai propan (C₃) sehingga membentuk suatu susunan C₆-C₃-C₆ (Prajogo dkk., 1997^b).

Apabila hesperidin dihidrolisa akan menghasilkan hesperitin (*metil eriodiktiol*), *ramnosa* dan *glukosa* (Trease and Evans, 1985). Jadi hesperitin merupakan *aglikon* dari hesperidin yaitu senyawa yang bebas dari unsur gula. Beberapa jenis flavonoid lain yang berkhasiat sebagai antifertilitas pria antara lain *(1)-katekin*, *kirantin dehidrokuersetin*, *eriodiktiol*, *naringenin*, *rutin*,

xantorhamnol, *kuersetin*, *ramnetin* dan *tektorigenin* (Farnsworth and Waller, 1982).



(a)



(b)

Gambar 1. Rumus senyawa hesperidin (a) dan senyawa hesperitin (b).
(Sumber : Mouly *et al.*, 1994).

2.2. Fertilisasi

Fertilisasi adalah peristiwa bersatunya spermatozoa dan sel telur. Fertilisasi secara *in vivo* terjadi di bagian ampula dari tuba falopii (Toelihere, 1985). Fertilisasi terdiri dari serangkaian langkah yang di mulai dengan penembusan

sel-sel granulosa yang membungkus sel telur, mukoprotein atau zona pelusida dan membran vitelin, dilanjutkan masuknya sel spermatozoa ke dalam inti sel telur (Partodihardjo, 1992). Spermatozoa sebelum sampai di tempat fertilisasi, harus mengalami proses pematangan (kapasitasi) terlebih dahulu (Hogan *et al.*, 1986).

Untuk masuk ke dalam sel telur, sel spermatozoa pertama-tama harus melewati sel-sel kumulus dengan gerakan peristaltik spermatozoa sendiri dan dibantu oleh Corona Penetrating Enzyme / CPE (Bearden and Fuquay, 1992) dan enzim hyaluronidase, yang berfungsi melarutkan asam hyaluronat yang dikeluarkan oleh kumulus ooforus. Enzim hyaluronidase mendepolarisasi asam hyalu-protein, yaitu bahan perekat yang menyatukan sel-sel kumulus satu sama lain. Penghapusan materi perekat tersebut melepaskan hubungan antara sel-sel kumulus sehingga spermatozoa dapat menembus lapisan sel telur berikutnya. Oleh karena itu enzim hyaluronidase memegang peranan yang sangat penting dalam proses fertilisasi (Partodihardjo, 1992).

Setelah mendispersi sel-sel kumulus, spermatozoa akan menempel pada zona pelusida. Zona pelusida memiliki reseptor spesifik terhadap spermatozoa, reseptor ini akan berubah setelah spermatozoa pertama menembus, sehingga tidak akan dikenali oleh spermatozoa lain. Reaksi ini disebut reaksi zona, yaitu reaksi pertahanan pertama terhadap polispermia (Sukra dkk., 1989).

Selanjutnya spermatozoa menembus lapisan berikutnya yaitu membran vitelin. Pada saat kepala spermatozoa berlekatan dengan membran vitelin

terjadilah reaksi kortek, yaitu reaksi pertahanan kedua terhadap polispermia. Hal ini terjadi karena butir-butir kortek (*cortical granules*) yang terdapat dalam selaput vitelin dilepaskan ke arah zona pelusida. Dengan demikian antara membran vitelin dan zona pelusida terdapat ruangan yang disebut ruang perivitelin. Ruangan ini makin lama makin meluas dan permulaan perluasannya dimulai dari tempat spermatozoa masuk (Sukra dkk., 1989).

Pertautan kepala spermatozoa dengan inti sangat penting untuk aktifasi sel telur (Partodihardjo, 1992). Sel telur bangkit dari keadaan istirahatnya dan terjadilah pembelahan reduksi kedua yang akan melepaskan benda kutub kedua dan menghasilkan pronukleus betina.

Spermatozoa mengalami perubahan kondensasi pada intinya sehingga membentuk pronukleus jantan (Hogan *et al.*, 1986). Tahap selanjutnya yaitu fusi gamet dan terbentuklah sigot. Akhir terjadinya fertilisasi dapat dilihat dengan sudah terbentuknya ruang perivitelin, pronukleus jantan, pronukleus betina, adanya kepala dan ekor dalam sel telur serta terbentuknya sigot (Gilbert, 1988).

2.3. Fertilisasi *In Vitro*

Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan manusia dengan memanfaatkan sel telur dan spermatozoa di luar tubuh. Saat ini fertilisasi *in vitro* telah banyak digunakan di bidang kedokteran umum dan hewan yang dipadukan dengan embrio transfer sebagai salah satu jalan pemecahan untuk menangani masalah infertilitas.

Dalam usaha pengembangbiakan ternak dengan meningkatkan produktifitas bibit unggul, fertilisasi *in vitro* dipadukan dengan transfer embrio juga merupakan salah satu alternatif. Sehingga dengan teknologi fertilisasi *in vitro* dapat menunjang kesejahteraan manusia (Gardner and Leese, 1993).

Fertilisasi *in vitro* pertama kali berhasil dilakukan pada manusia oleh Steptoe dan Edward tahun 1978 di Inggris (Tomaszewska *et al.*, 1991), yang melahirkan Louise Brown. Sejak itu ratusan klinik fertilisasi *in vitro* berdiri di seluruh dunia yang melahirkan lebih dari 20.000 bayi (Gardner and Leese, 1993).

Salah satu penggunaan teknologi ini adalah untuk memperoleh embrio dalam jumlah besar dan berkembang secara seragam dibandingkan dengan embrio yang dikumpulkan dari perkawinan alam (Hogan *et al.*, 1986) Tersedianya embrio yang berkualitas dalam jumlah yang banyak dengan umur (stadium perkembangan) yang seragam merupakan salah satu faktor penunjang keberhasilan transfer embrio dan pengembangan penelitian di bidang bioteknologi reproduksi (Monk, 1987).

Menurut First and Parrish, (1987) fertilisasi *in vitro* membutuhkan :

- (1) sistem memanen sel telur secara efisien dan tidak merusak sel telur,
- (2) pematangan inti, sitoplasma dan sel-sel kumulus dari sel telur,
- (3) sistem kultur yang tidak merusak,
- (4) sistem untuk kapasitas spermatozoa serta
- (5) sistem dan kondisi yang efisien untuk melakukan fertilisasi.

2.4. Perkembangan Embrio

Proses perkembangan embrio mencit diawali dengan fertilisasi sel telur oleh spermatozoa di bagian ampula dari tuba falopii, dan membentuk sigot (Toelihere, 1985). Sel telur yang telah difertilisasi ini terdiri dari inti, sitoplasma, membran vitelin dan pada bagian luarnya diselubungi oleh zona pelusida. Pada saat diovulasikan sel telur berikut zona pelusidanya dikelilingi oleh sel-sel granulosa (Mc. Donald and Pineda, 1989). Untuk dapat melakukan pembuahan spermatozoa harus mengalami proses kapasitasi terlebih dahulu di dalam saluran alat kelamin betina (Hafez, 1993; Fulka, 1994).

Setelah tahap sigot, embrio mengalami pembelahan secara mitosis (Gilbert, 1988). Pembelahan sigot berlangsung secara cepat sehingga sel anak tidak sempat tumbuh dan semakin kecil, sel anak ini disebut blastomer (Sukra dkk., 1989).

Ketika memasuki tahap morula terjadi proses compaction yaitu terbentuknya suatu hubungan antar seluler sehingga batas antar blastomer tidak jelas. Besar morula tidak berbeda dengan sigot, hal ini karena selama proses *cleavage*, zona pelusida tetap utuh (Sukra dkk., 1989). Setelah bentuk morula tercapai embrio mulai memasuki tanduk rahim melewati utero-tubal junction yang sempit (Yatim, 1991). Di daerah ini embrio mulai berkembang menjadi blastula. Sebelum mengalami implantasi pada dinding tanduk rahim, embrio melakukan spacing (Sukra dkk., 1989; Gilbert, 1988). Blastula mencit terdiri

dari dua macam sel yaitu sel-sel utama (inner cell mass / ICM) dan sel-sel tropoblast.

2.5. Medium Kultur *In Vitro*

Pemakaian medium kultur sangat bergantung dari tujuan kultur serta materi yang akan dikultur. Kultur sel gamet sampai dengan tahap blastula konstituennya relatif homogen dibandingkan kultur jaringan atau organ. Kultur embrio harus mampu menopang daya tahan hidup dan perkembangan embrio yang lebih baik karena embrio merupakan sel-sel muda yang aktif berbiak. Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tersebut perlu diperhatikan sifat-sifat kimia dan fisik yang mempengaruhi medium kultur sehingga meningkatkan keberhasilan kultur *in vitro* (Malole, 1990).

Media buatan disusun dengan cara mencampurkan berbagai bahan kimia anorganik menjadi satu larutan yang memenuhi kebutuhan sel. Berbagai bahan kimia tersebut memiliki sifat kelarutan, kemurnian, kestabilan, kandungan ion yang berbeda-beda dan bila dicampur dalam satu larutan dapat memberikan reaksi yang mungkin tidak menguntungkan bila tidak diperhatikan cara penanganan yang sempurna (Malole, 1990).

Sifat-sifat fisik yang perlu diperhatikan pada media buatan adalah pH, osmolaritas, suhu, kekentalan (viskositas), tegangan permukaan dan bufer (Malole, 1990). Sebagian besar sel dapat tumbuh baik pada pH 7,4 walaupun pH optimum untuk pertumbuhan berbagai macam sel mempunyai variasi tetapi

cukup kecil. Sebagian besar kultur sel memiliki toleransi yang besar terhadap perubahan osmolaritas atau tekanan osmose. Tekanan osmose dapat ditoleransi oleh sebagian sel berkisar antara 260-320 mOsm/kg (Freshney, 1987).

Suhu mempengaruhi pH melalui peningkatan kelarutan CO₂ pada suhu rendah dan mungkin melalui perubahan ionisasi pH dari bufer (Malole, 1990). Suhu yang direkomendasikan untuk kultur sel adalah 36,5°C menyerupai suhu tubuh tetapi diatur sedikit lebih rendah untuk menjaga keamanan (Freshney, 1987). Kepekatan medium dipengaruhi oleh jumlah serum dalam medium dan kepekatan hanya sedikit mempengaruhi sel. Tekanan permukaan medium dapat digunakan untuk membantu perlekatan jaringan pada permukaan substrat (Malole, 1990).

Sistem bufer yang biasa terdapat dalam media adalah sistem karbondioksida-bikarbonat sama seperti dalam darah. Untuk itu diperlukan penambahan karbondioksida pada ruangan di atas medium untuk mencegah keluarnya karbondioksida, berarti meningkatkan konsentrasi ion hidroksil. Daya bufer dari medium ditingkatkan oleh adanya ion fosfat yang terdapat dalam larutan garam seimbang. Bila diinginkan terjadi keseimbangan pH, pengaturannya dapat dilakukan dengan penambahan karbondioksida 5% (Malole, 1990).

Menurut Whittingham (1971) yang dikutip oleh Bradley (1987) pemilihan medium kultur tergantung pada fase embrio yang akan dikultur. Fase *cleavage*

tidak memiliki metabolisme glukosa dasar, untuk itu dikultur pada media bicarbonat-buffer sederhana yang ditambah dengan asam piruvat sebagai sumber karbon. Medium pilihan yang direkomendasikan oleh Bradley (1987) adalah medium M₁₆. Toksisitasnya dapat diatasi dengan penambahan BSA 4 mg/ml sebelum digunakan. Setelah itu disterilkan dengan filtrasi dilewatkan pada filter nitro cellululer 0,2 μ m. Medium M₁₆ tanpa BSA dapat disimpan pada suhu 4°C bertahan sampai tiga minggu.

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian meliputi persiapan dan perlakuan hewan percobaan, koleksi sel telur, koleksi sperma, fertilisasi *in vitro*, kultur *in vitro* embrio dan pengamatan perkembangan embrio. Penelitian ini dilakukan mulai Maret sampai Juli 1999.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

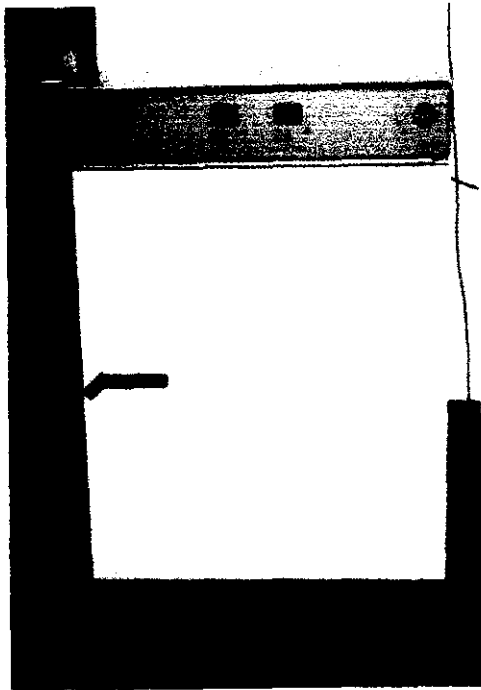
Bahan Penelitian:

Bahan yang dipakai dalam penelitian adalah : Hesperitin (Sigma), carboxymethylcellulose (CMC), medium M₁₆, Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma), Phospat Buffer Saline (PBS) (Gibco, USA), Penisillin, Streptomisin, Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Intervet), Human Chorionic Gonadotropin (hCG) (Intervet) dan mineral oil (Squibb).

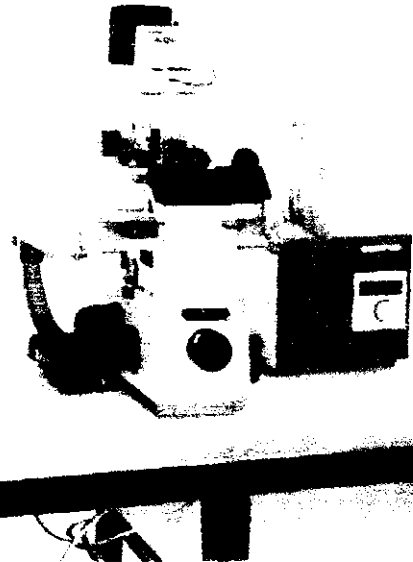
Alat perlengkapan:

Peralatan yang dipakai dalam penelitian adalah: inkubator CO₂, mikroskop inverted, petridish disposable 35 X 10 (153066) (Nuclon), refrigator, gunting mikro, pinset mikro, syringe (1 cc, 5 cc, 10 cc) (Terumo), pipet Pasteur (Jerman), mikropipet otomatis, millipore 0,22 µm, sonde, kandang mencit dan tempat

minum serta peralatan habis pakai seperti kapas, tissue, aluminium foil dan lain-lain.



Gambar 2. Inkubator CO₂.



Gambar 3. Mikroskop inverted.



Gambar 4. Pemberian hesperitin per oral.

Hewan percobaan:

Mencit jantan dewasa umur tiga sampai empat bulan sebanyak 40 ekor dan lima ekor mencit betina umur dua bulan dari strain Balb C. Sebelum diperlakukan, semua mencit diadaptasikan sesuai dengan kondisi lingkungan penelitian selama satu minggu.

3.3. Metode Penelitian**Persiapan hesperitin**

Hesperitin, dengan berat yang telah ditentukan (lampiran 2), dilarutkan ke dalam aquabidestilata dengan menggunakan dispensator carboxymethylcellulose (CMC) (Amilah, 2000).

Perlakuan hewan percobaan

Empat puluh ekor mencit jantan fertil yang telah dilakukan uji fertilitas dibagi dalam empat kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Perlakuan yang diberikan terdiri atas hesperitin dengan dosis 31mg/kg BB (dosis I), 62 mg/kg BB (dosis II) dan 124 mg/kg BB (dosis III) serta kontrol yang tidak diberi perlakuan, hesperitin diberikan per oral dengan menggunakan sonde sekali sehari selama 52 hari.

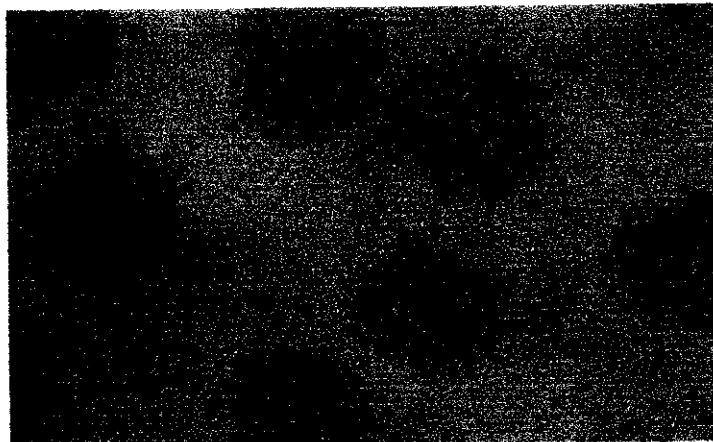
Sperma dikoleksi dari bagian kauda epididimis setelah mencit dikorbakan dengan cara mematahkan (*dislokasio*) leher. Kauda epididimis yang diambil dicuci dalam medium PBS sebanyak tiga kali kemudian dipindahkan ke medium M₁₆ sambil dihancurkan dengan menggunakan gunting mikro.



Gambar 5. Uterus dan tuba falopii mencit.



Gambar 6. Kantung fertilisasi.



Gambar 7. Oosit mencit.

Superovulasi, koleksi sel telur dan fertilisasi *in vitro*

Dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut:

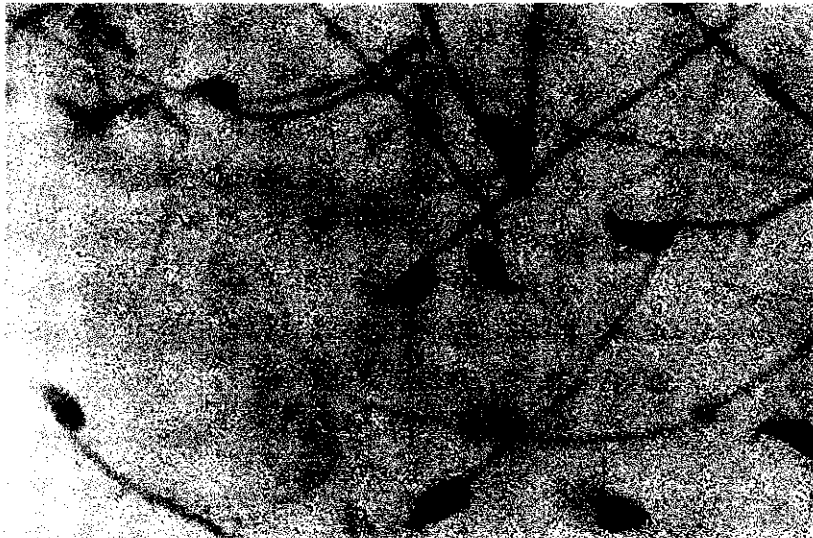
1. Melakukan superovulasi dengan menggunakan PMSG dan hCG, yaitu mencit disuntik secara intra peritoneal dengan PMSG 5 IU, 48 jam kemudian disuntik dengan hCG 5 IU dan mencit langsung dikawinkan dengan pejantan vasektomi.
2. Tujuh belas jam kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina dan langsung dilakukan pembedahan terhadap betina-betina yang positif kawin. Sel telur dikoleksi dari tuba falopii bagian ampula, yaitu di dalam kantung fertilisasi.
3. Sel telur yang telah dipanen dicuci berturut-turut dengan medium PBS sebanyak tiga kali, kemudian dicuci dengan medium M₁₆ sebanyak tiga kali, baru dipindahkan dalam medium fertilisasi.
4. Sperma dari mencit jantan diambil dari kauda epididimis, setelah dikoleksi dengan menggunakan pipet yang telah dimodifikasi dibenamkan dalam medium fertilisasi yang telah berisi sel telur, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama enam jam, kemudian diamati apakah terjadi fertilisasi.

Kultur *in vitro* embrio

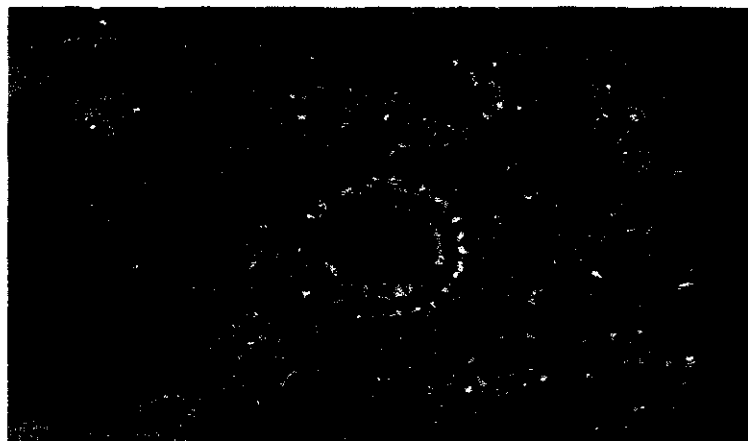
Sel telur yang berhasil difertilisasi dilakukan kultur lebih lanjut. Perkembangan embrio diamati tiap 24 jam sampai sigot mencapai tahap blastula.



Gambar 8. Testis menciit.

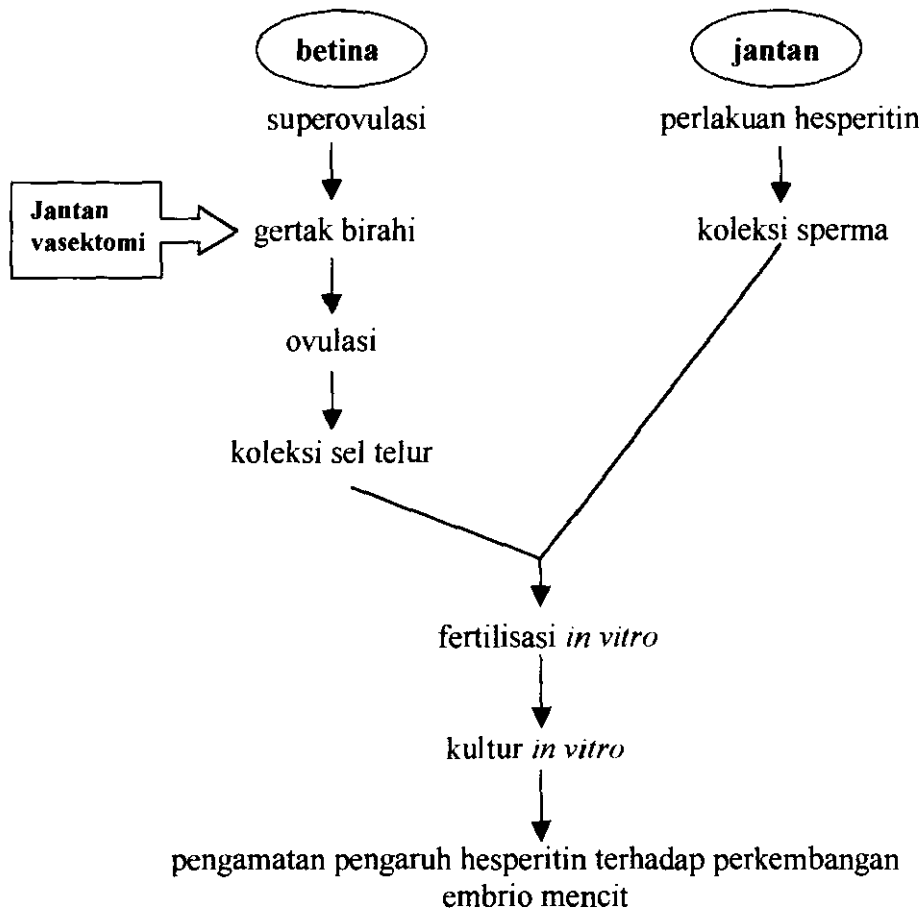


Gambar 9. Spermatozoa menciit



Gambar 10. Fertilisasi *in vitro*.

3.4. Rancangan Penelitian



3.5. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah:

1. Jumlah sigot yang berkembang menjadi embrio tahap dua sel
2. Jumlah sigot yang berkembang menjadi embrio tahap empat sel
3. Jumlah sigot yang berkembang menjadi embrio tahap delapan sel atau morula
4. Jumlah sigot yang menjadi embrio tahap blastula.

3.6. Analisis Data

Data diperoleh berdasarkan jumlah sigot yang berkembang mencapai tahap blastula. Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan uji statistik berdasarkan Fisher Exact Test (Djarwanto, 1987), dengan taraf signifikansi 5 %.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1. Fertilisasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian hesperitin dengan dosis 31 mg/kg BB (dosis I), 62 mg/kg BB (dosis II) dan 124 mg/kg BB (dosis III) pada mencit jantan tidak mampu menghambat fertilisasi. Frekuensi fertilisasi pada kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) (Tabel 1). Walaupun pada perlakuan hesperitin dosis I dan dosis II masing-masing tidak terjadi fertilisasi sebesar 10 % dari sampel, namun tidak berbeda secara statistik.

Tabel 1. Jumlah sel telur yang berhasil difertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*

| Perlakuan | Dosis | Fertilisasi | |
|------------|-------|-------------|-----|
| | | (+) | (-) |
| Kontrol | - | 10(100) | 0 |
| Hesperitin | I | 9(90) | 1 |
| Hesperitin | II | 9(90) | 1 |
| Hesperitin | III | 10(100) | 0 |

Ket.: Angka di dalam kurung menunjukkan persentase fertilisasi.

4.2. Kultur Embrio

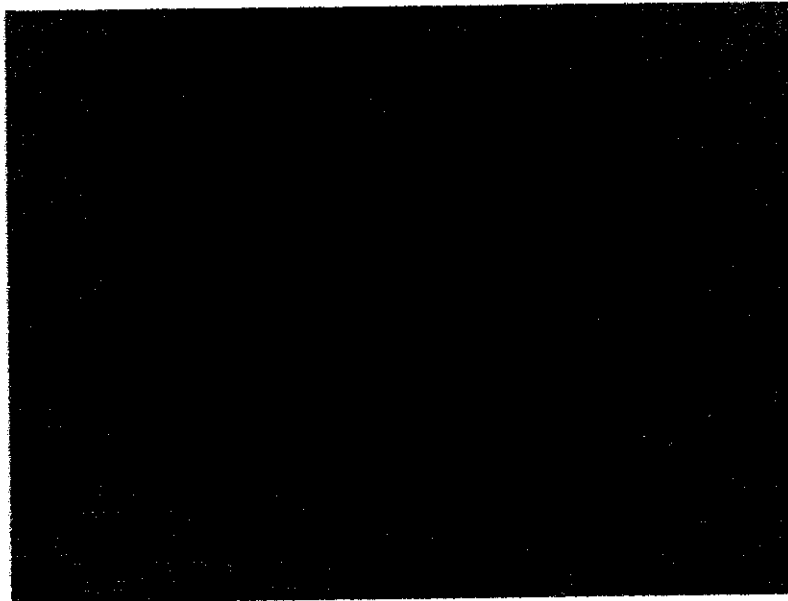
Tabel 2 menunjukkan bahwa semua sel telur yang berhasil difertilisasi mampu berkembang menjadi embrio tahap satu sel, baik pada perlakuan hesperitin dan kontrol. Namun pada tahap dua sel, perkembangan embrio pada kontrol berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Tabel 2. Hasil perkembangan embrio mencit pada kultur *in vitro*.

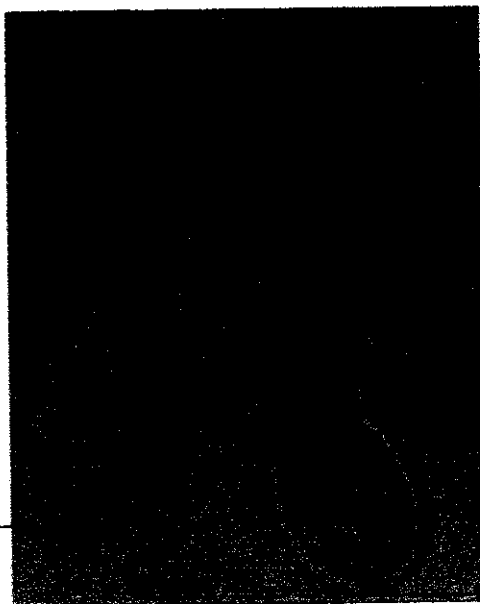
| Perlakuan | Dosis | Juml. Oosit | Perkembangan embrio | | | | |
|------------|-------|-------------|---------------------|---------|-------|--------|----------|
| | | | 1 sel | 2 sel | 4 sel | morula | blastula |
| Kontrol | - | 10 | 10(100) | 10(100) | 8(80) | 4(50) | 0(0) |
| Hesperitin | I | 9 | 9(100) | 1(11,1) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| Hesperitin | II | 9 | 9(100) | 3(33,3) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| Hesperitin | III | 10 | 10(100) | 1(10) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |

Ket.: Angka di dalam kurung menunjukkan persentase embrio yang berkembang.

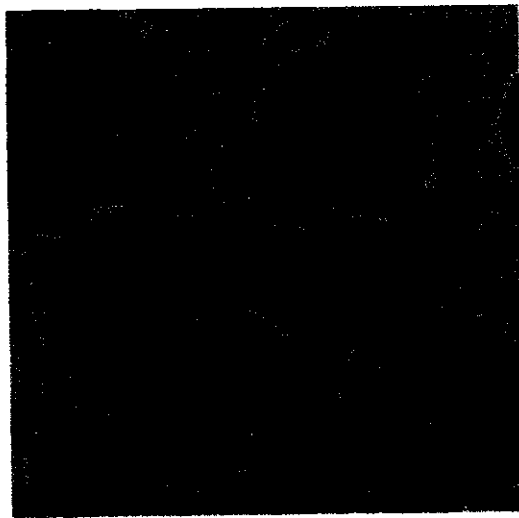
Akhirnya semua embrio pada kelompok perlakuan tidak dapat berkembang menjadi embrio tahap empat sel, berbeda dengan kontrol ($p < 0,05$). Perkembangan embrio pada kontrol akhirnya juga berhenti yaitu pada tahap delapan sel (morula) dan tidak berkembang mencapai tahap blastula.



(a)



(b)



(c)

Gambar 11. Tahap-tahap perkembangan embrio mencit. Tahap satu sel (a), tahap dua [→] dan empat sel [→] (b) serta morula (c).

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Fertilisasi

Kegagalan hambatan fertilisasi pada penelitian model antifertilitas menggunakan hesperitin ini disebabkan karena sifat kelarutan obat yang kurang tinggi. Obat di dalam tubuh akan berusaha menembus sawar organ secara bergantian bersaing dengan jalur transpor zat lain. Ketika mencapai tempat aksi (reseptor sel), obat akan memberikan respon biologik yang dikehendaki bila mengikat reseptor sel tersebut. Supaya mencapai tempat aksi seluler dan berikatan, semua zat yang mempunyai aktifitas biologik harus mempunyai atau mencapai kelarutan dalam cairan ekstraseluler yang polar. Hesperitin tidak mampu berikatan dengan reseptor yang mempunyai aktifitas menghambat kerja dari enzim hyaluronidase karena sifat kelarutannya tersebut (Amilah, 2000).

Oleh karena itu sebelum melihat atau mengamati faktor dan kekuatan interaksi antara obat dengan reseptor, harus dipertimbangkan sifat fisikokimia yang meliputi absorpsi, distribusi dan metabolisme obat. Pada penelitian ini digunakan CMC sebagai dispensator obat, yaitu pelarut dasar obat bentuk suspensi. Larutan hesperitin ini belum / tidak mencapai kelarutan ekstraseluler yang polar sehingga tidak mampu berikatan dengan reseptornya.

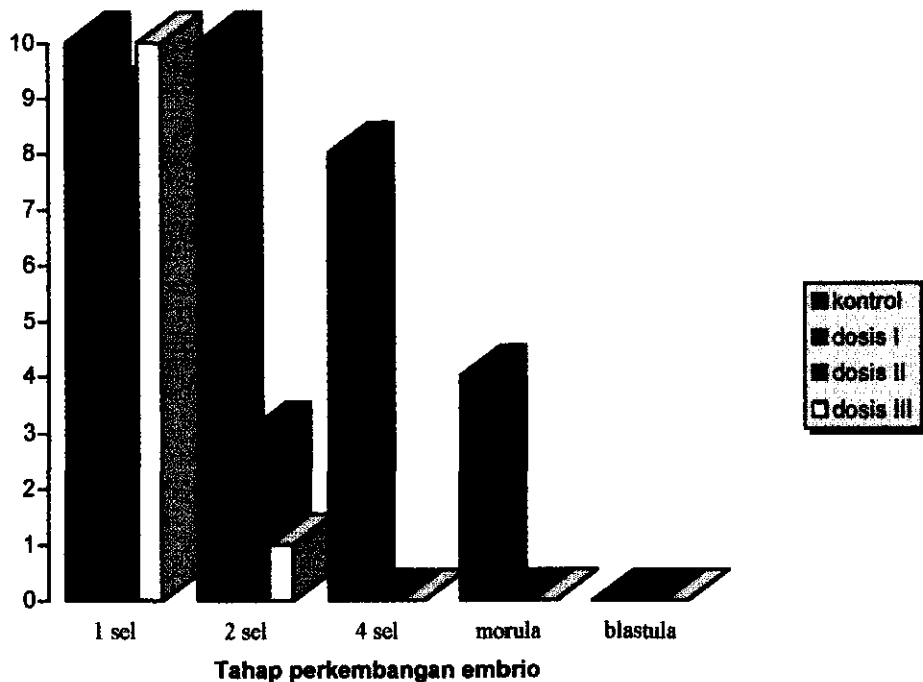
Kegagalan hesperitin berikatan dengan reseptornya mengakibatkan masih dilepaskannya enzim hyaluronidase dari kepala spermatozoa saat fertilisasi, sehingga spermatozoa mampu memfertilisasi sel telur. Menurut Gilbert (1988) terjadinya fertilisasi dapat dilihat dengan sudah terbentuknya pronukleus jantan dan betina, adanya kepala dan ekor spermatozoa dalam sel telur dan terbentuknya sigot.

5.2. Kultur Embrio

Kultur embrio dari kelompok perlakuan hesperitin (dosis I, II dan III) tingkat perkembangannya rendah, kebanyakan embrio masih tetap pada tahap satu sel walaupun ada sebagian yang membelah menjadi dua sel. Hal ini berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$) embrio yang berkembang menjadi dua sel mencapai 100 %, sedangkan pada perlakuan hesperitin dosis I hanya mencapai 11,1 %, dosis II 33,3 % dan dosis III 10 %. Perkembangan selanjutnya embrio tahap dua sel dari kelompok perlakuan tidak mampu berkembang menjadi empat sel apalagi mencapai morula atau blastula, dan berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$). Tingkat pertumbuhan embrio pada kontrol masih tinggi yaitu 80 % pada tahap empat sel dan 50 % pada tahap morula.

Embrio dari kelompok perlakuan hesperitin mengalami hambatan perkembangan. Sigot (embrio tahap satu sel) yang dihasilkan baik melalui

fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo*, di dalam medium kultur sering mengalami hambatan perkembangan (Miyoshi *et al.*, 1994).



Gambar 12. Grafik perkembangan embrio.

Penjelasan lebih lanjut mengenai kultur *in vitro* embrio menyatakan bahwa kendala yang sering dialami adalah kesulitan untuk mengkultur embrio dari tahap satu sel sampai tahap delapan sel. Hal ini sesuai dengan pendapat Sawai *et al.* (1994) bahwa pada kultur embrio mencit tahap satu sel (sigot), kesulitan embrio untuk berkembang lebih lanjut sering terjadi karena adanya hambatan pada tahap dua sel ke tahap selanjutnya. Rendahnya tingkat keberhasilan kultur embrio dini secara *in vitro* salah satunya dipengaruhi oleh kondisi fisiologis medium (Aurich and Han, 1994).

Perkembangan embrio pada kontrol mengalami penurunan pada tahap morula dan tidak berkembang mencapai tahap blastula. Hal tersebut karena selama penelitian ini berlangsung medium kultur tidak diganti maupun diberi zat tambahan sebagai suplementasi nutrisi bagi embrio untuk berkembang, sehingga nutrisi yang tersedia untuk perkembangan menjadi berkurang (Widjiati, 1997; Widjiati dkk., 1998). Hal ini sejalan dengan pendapat Sukra dkk. (1993) bahwa semakin dini melakukan kultur, jumlah embrio yang berkembang makin menurun karena nutrisi untuk pertumbuhan semakin berkurang.

Di antara zat-zat yang diperlukan dalam media adalah piruvat, glukosa dan laktat yang merupakan sumber energi utama yang ditambahkan ke dalam medium kultur embrio mamalia pada umumnya (Gardner and Leese, 1990). Energi substrat diperlukan untuk mendukung perkembangan embrio preimplantasi dari tahap satu sel hingga mencapai tahap blastula. Embrio mencit satu sel pada perkembangan *in vitro* akan dapat melewati tahap dua sel dengan sedikit glukosa tetapi tidak akan mencapai blastula jika dikultur dalam medium dengan sedikit mengandung glukosa (Chatot *et al.*, 1990). Untuk itu pemberian glukosa pada 36 sampai 48 jam setelah kultur dapat membantu perkembangan embrio mencit mencapai tahap blastula (Sawai *et al.*, 1994). Widjiati (1997) juga menyatakan bahwa penambahan glukosa dengan konsentrasi 5,0 mmol/liter dapat meningkatkan pertumbuhan embrio sampai tahap morula (34,5 %) dan tahap blastula (14,5 %).

Pada penelitian ini hanya memakai medium kultur M₁₆ standar yang ditambahkan BSA dan tidak dilakukan penggantian medium selama kultur berlangsung, sehingga pada kontrol tidak dapat berkembang mencapai tahap blastula. Medium M₁₆ dapat mendukung embrio untuk mengatasi hambatan perkembangan pada kelompok kontrol (keadaan normal), terbukti pada tingkat pertumbuhan embrio empat sel yang masih tinggi (80 %).

Embrio dari kelompok perlakuan karena pengaruh hesperitin mengalami hambatan perkembangan, sehingga embrio tidak dapat berkembang menjadi empat sel. Ada dua kemungkinan peristiwa untuk menjelaskan penyebab hambatan perkembangan tersebut. Karena kegagalan hesperitin berikatan dengan reseptor enzim hyaluronidase spermatozoa, maka hesperitin akan terakumulasi pada suatu tempat, karena telah dilaporkan oleh Weintroub *et al.* (1995) bahwa naringin dan hesperitin keduanya tidak di ekskresikan melalui urin, terbukti tidak terdeteksi secara spektrometri dari urin yang dikumpulkan selama perlakuan pemberian naringin dan hesperitin.

Kemungkinan pertama hesperitin gagal menembus membran sel spermatozoa sehingga masih tertinggal dan menetap pada cairan ekstraseluler. Pada saat koleksi sperma dari kauda epididimis, hesperitin ikut terambil bersama sperma yang selanjutnya akan mempengaruhi medium fertilisasi *in vitro* dan medium kultur. Medium kultur menjadi tidak optimum karena reaksi hesperitin dengan substrat-substrat di dalam medium. Kandungan medium kultur salah satunya adalah unsur gula (glukosa) yang diduga akan

diikat oleh hesperitin, karena hesperitin merupakan *aglikon* yaitu senyawa yang bebas dari unsur gula, tetapi sebelum dihidrolisa masih berikatan dengan glukosa. Keadaan ini bisa membuat kondisi medium kultur menjadi tidak optimum, walaupun pada awal perkembangan embrio tidak memerlukan banyak glukosa namun tidak berarti bahwa tidak memerlukan glukosa sama sekali. Menurut Kim *et al.* (1993) kondisi medium kultur yang tidak optimum dapat mengganggu perkembangan embrio.

Kondisi tersebut di atas menghambat pengambilan energi oleh embrio dari medium kultur sehingga embrio kekurangan energi untuk berkembang atau untuk keperluan metabolisme sel. Akhirnya embrio dalam keadaan seperti istirahat dan berhenti berkembang.

Kultur sigot tikus putih dan mungkin juga pada mamalia lain, membutuhkan piruvat untuk mencukupi kebutuhannya. Laktat bereaksi secara sinergis dengan piruvat pada perkembangan embrio tahap dua sel. Jadi pada awal perkembangan, embrio membutuhkan energi yang berasal dari piruvat dan laktat, sedang glukosa dibutuhkan dalam jumlah sedikit untuk mendukung metabolisme laktat. Awal pembelahan pertama embrio mencit dapat memakai piruvat, tetapi tidak bisa memakai laktat jika tidak ada glukosa. Hal ini disebabkan oleh perbandingan ATP dan ADP yang tinggi (Takahashi and First, 1992). Menurut Rosenkrans yang dikutip oleh Widjiati (1997) perbandingan ATP dan ADP yang tinggi menyebabkan pengeluaran elektron menjadi kurang seimbang sehingga NAD^+ yang diperlukan untuk mengubah

laktat menjadi piruvat dengan bantuan laktatdehidrogenase menjadi terbatas. Namun mekanisme pengikatan unsur gula tersebut oleh hesperitin belum bisa dijelaskan.

Kemungkinan yang kedua, hesperitin sudah menembus membran sel spermatozoa tetapi tidak berikatan dengan reseptor, maka hesperitin akan dapat mempengaruhi atau mengganggu reaksi-reaksi metabolisme yang terjadi di dalam sitoplasma sel spermatozoa. Telah banyak dilaporkan tentang pengaruh senyawa-senyawa flavonoid lain pada metabolisme protein baik secara langsung maupun tidak langsung. Aktifitas flavonoid tersebut diduga bisa terjadi pada hesperitin

Nakahata *et al.* (1999) melaporkan bahwa baicalein menghambat produksi protein dari kelompok serine / threonine-kinase. Ueng *et al.* (1999) melaporkan pengaruh *in vitro* dan *in vivo* dari naringin pada sel hati tikus putih. Penambahan aglikon naringin pada medium mengurangi aktifitas beberapa protein dari mikrosom hati tikus putih. Pemberian per oral cairan yang berisi 10 mg/ml naringin selama tujuh hari pada tikus putih menyebabkan pengurangan aktifitas protein-protein tersebut serta menurunkan level protein P450.

Dari contoh penemuan di atas, menunjukkan bahwa flavonoid (baicalein, naringin) bisa mengganggu produksi dan kerja protein atau enzim-enzim yang dibutuhkan dalam metabolisme sel secara langsung maupun tidak langsung, diduga hesperitin yang terakumulasi pada intraseluler mengakibatkan

gangguan metabolisme protein yang berhubungan dengan enzim-enzim yang dibutuhkan embrio untuk perkembangan.

Stojanov and O'Neill (2000) melaporkan bahwa setelah fertilisasi *in vitro* dan kultur *in vitro* tidak ada penyimpangan yang nyata pada kondisi normal saat pertama transkripsi genom sigot. Namun pada tahap selanjutnya jika kondisi tidak normal terdapat penundaan transkripsi dari beberapa gen spesifik, diantaranya adalah faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh embrio pada awal perkembangan. Penyimpangan ini bisa menyebabkan penurunan viabilitas embrio yang dikultur.

Hesperitin secara tidak langsung bisa mendukung penundaan transkripsi genom embrio melalui gangguan sintesis atau hambatan kerja protein saat transkripsi terjadi. Sehingga embrio mengalami penyimpangan produksi faktor pertumbuhan dan reseptornya, yang akhirnya menurunkan viabilitas embrio. Namun gangguan sintesis atau hambatan kerja protein pada peristiwa transkripsi genom embrio tersebut belum bisa dijelaskan.

Akumulasi hesperitin pada ekstraseluler dan intraseluler sel spermatozoa bisa terjadi secara bersamaan, sehingga pengaruhnya pada perkembangan embrio semakin besar. Dari luar hesperitin mengganggu pengambilan energi oleh embrio dari medium, sedang dari dalam sel hesperitin mengganggu produksi faktor pertumbuhan embrio, sehingga embrio tidak bisa berkembang dan viabilitasnya menurun, akhirnya embrio tidak berkembang dan mati.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian hesperitin per oral pada mencit jantan dengan dosis 31, 62 dan 124 mg/kg BB dapat menghambat perkembangan embrio. Embrio tidak berkembang mencapai tahap empat sel apalagi tahap morula atau blastula.

6.2. Saran

Dari hasil penelitian dapat disarankan:

1. Melakukan penelitian untuk mengetahui tempat akumulasi hesperitin.
2. Melakukan penelitian tentang mekanisme pengaruh hesperitin terhadap perkembangan embrio jika hesperitin terakumulasi di cairan ekstraseluler atau intraseluler spermatozoa.

RINGKASAN

RINGKASAN

Pada tahun 1948-1954 banyak laporan tentang aktifitas hesperidin sebagai antifertilitas pada hewan dan manusia (Zaneveld and Polakoski, 1976). Dilaporkan kembali oleh Prajogo dkk. (1997^b), hesperidin tidak mendispersi sel-sel kumulus sel telur pada fertilisasi *in vitro*. Selanjutnya dilakukan penelitian tentang aktifitas hesperitin, yang merupakan hasil hidrolisa dari hesperidin, sebagai antifertilitas pada mencit, hesperitin gagal menghambat fertilisasi (Amilah, 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hesperitin terhadap perkembangan embrio pada kultur *in vitro*, setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 40 mencit jantan strain BALB C berumur 3-4 bulan yang dibagi dalam empat kelompok secara acak, tiga kelompok perlakuan dan satu kontrol. Kelompok perlakuan diberi larutan hesperitin per oral selama 52 hari dengan dosis 31, 62 dan 124 mg/kg BB, kelompok kontrol tidak diberi hesperitin. Sebelum digunakan dilakukan uji fertilitas terhadap hewan coba. Sperma diambil dari kauda epididimis. Setelah uji antifertilitas dengan fertilisasi *in vitro*, sel telur yang berhasil difertilisasi dieramkan dalam medium kultur *in vitro* untuk mengetahui pengaruh hesperitin terhadap perkembangan embrio. Data diperoleh dengan menghitung jumlah perkembangan embrio pada setiap tahap perkembangan sampai tahap blastula, kemudian dianalisis dengan uji statistik Fisher Exact Test.

Hasil penelitian menunjukkan adanya hambatan perkembangan embrio pada kelompok perlakuan. Embrio dari kelompok perlakuan tidak mampu berkembang lebih lanjut. Berbeda nyata dengan kontrol ($p < 0,05$) yang mampu berkembang mencapai tahap morula.

Hambatan perkembangan embrio dari kelompok perlakuan bisa disebabkan karena hesperitin terakumulasi di ekstraseluler yang menyebabkan medium kultur menjadi tidak optimum sehingga mempengaruhi pengambilan energi oleh embrio dari medium. Penyebab lain karena hesperitin terakumulasi di intraseluler spermatozoa sehingga mempengaruhi faktor pertumbuhan embrio.

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk mengetahui tempat akumulasi hesperitin dan mengetahui mekanisme hambatan hesperitin terhadap perkembangan embrio.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Amilah, S. 2000. Pengaruh hesperitin terhadap fungsi penetrasi spermatozoa mencit *secara in vivo* dan *in vitro*. Tesis. UNAIR. Surabaya.
- Aurich, C. and J. Han. 1994. *In vitro* maturation, fertilization and culture of bovine oocyte in modified menezzo B₂ medium. J. An. Reprod. Sci. 35: 153-162.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1992. Applied Animal Reproduction. 3rd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.
- Bradley, A. 1987. Production and analysis of chimeric mice. in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach. Ed. by E. J. Robertson. IRL PRESS. Washington DC. 5: 113-152.
- Chatot, C., L. Lewis, I. Rorres and C. A. Ziomek. 1990. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in C2B medium. J. Biol. Reprod. 42: 432-440.
- Djarwanto, P., 1987. Kumpulan Soal dan Penyelesaiannya Statistik Non-parametrik. BPFE. Yogyakarta. 3: 105-107.
- First, N. L. and J. J. Parrish. 1987. *In Vitro* Fertilization of Ruminant. J. Reprod. Fert. 34: 151-165.
- Farnsworth, N. R. and D. P. Waller. 1982. Current status of plant products reported to inhibit sperm. Research Fronties in Fertility Regulation.
- Freshney, R.I. 1987. Culture of Animal cells: A Manual of Basic Technique. Second. Ed. Alan R. Liss Inc. New York.
- Fulka, J. 1994. Oocyte collection and *in vitro* maturation. Proceedings regional training course embryo bisection and *in vitro* fertilization in cattle, sheep and pig. FAO-UNOP. Regional coordinating centre. ANBAPH. China.
- Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1990. Concentration of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J. Reprod. Fert. 88: 361-368.

- Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1993. Assesment of Embryo Metabolism and Viability In Hand Book of *In Vitro* Fertilization. CRC PRESS. Tokyo. 10: 196-208.
- Gilbert, S. F. 1988. Development Biology. 2nd Ed. Sinuer associate. Inc. Plubisher. Sunderland, Massachusetts. 313-330.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hogan, B., F. Costantini and E. Lacy. 1986. Manipulating the Mouse Embrio. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York. A: 17-71.
- Kim, J. H., H. Funahasi, K. Niwa and K. Okuda. 1993. Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi defined medium. J. Theriogenology. 34: 879-886.
- Malole, M. B. M. 1990. Kultur Sel dan Jaringan Hewan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mc. Donald, L. E. and M. H. Pineda. 1989. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Miyoshi, K., H. Funahashi, K. Okuda and K. Niwa. 1994. Development of rat one-cell embryos in a chemically defined medium: Effect of glucose, phospate and osmolarity. J. Reprod. Fert. 100: 21-26.
- Monk, M. 1987. Mammalian development a practical approuch. IRL PRESS. Washington DC.
- Mouly, P. P., C. R. Arzouyan, E. M. Gaydou and J. M. Estienne. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. J. Agric. Food Chem. 42: 70-79.
- Nakahata, N., R. Kyo, M. Kutsuwa and Y. Ohizumi. 1999. Inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade by baicalein, a flavonoid of natural origin. Nippon Yakurigaku Zasshi (Japanese Article): 114.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Ternak. Fakultas Kedokteran Veteriner. Jurusan Reproduksi. Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.

- Prajogo, B. E. W., A. Khoiril, I. G. P. Santa dan Soeharno. 1997^a. Pengaruh ekstrak diklormetan dan metanol daun *Gandarusa vulgaris Ness* terhadap spermatogenesis mencit. Yogyakarta.
- Prajogo, B. E. W., Widjiati, Hamdani dan Aucky H. 1997^b. Hambatan hesperidin terhadap penetrasi spermatozoa mencit dalam proses fertilisasi *in vitro*. Simposium Penelitian Obat Alami IX. Yogyakarta.
- Sawai, K., J. M. Kim, K. Okuda and Niwa. 1994. Effect of glucose in semi defined culture medium on development of mouse 1-cell embryos. *J. Mamm. Ova. Res.* 11: 8-16.
- Siti, S. 1995. Khasiat Gandarussa sebagai obat tradisional. *Warta APINMAP. Indonesia.* Vol. V: 8-9.
- Smith, J. B. dan Mangkoewidjojo. 1986. Pemeliharaan, Perubahan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. UI PRESS. Jakarta.
- Stojanov, T. and C. O'Neill. 2000. Fertilization and culture of mouse embryos *in vitro* alters the pattern of expression of many, but not all, genes from the zygote genome. *J. Theriogenology*: 413.
- Sukra, Y. L., I. Djuwita, A. Boediono dan S. Golfiani. 1993. Studi tentang pengembangan teknik fertilisasi *in vitro*, kultur, pewarnaan kromosom dan pematangan embrio dalam proses perekayasaan embrio. Prosiding seminar hasil-hasil penelitian. Cisarua. Bogor.
- Sukra, Y., L. Rahardja dan I. Djuwita. 1989. Embriologi I. PAU. IPB. Bogor.
- Takahashi, Y. and N. L. First. 1992. *In Vitro* development of bovine one-cell embryos. Influence of glucose lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *J. Theriogenology.* 37: 963-978.
- Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.
- Tomaszewka, M. W., I. K. Utama, I. G. Putu dan T. d. Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Trease, G. E. and W. C. Evans. 1985. Pharmacognosy. 12th Ed. English Language Book Society. London.

- Ueng, Y. F., Y. L. Chang, Y. Oda, S.S. Park, J. F. Liao, M. F. Lin and C. F. Chen. 1999. *In vitro* and *in vivo* effects of naringin on cytochrome P450-dependent monooxygenase in mouse liver. *J. Live Sci.*: 65.
- Weintraub, R. A., B. Amser, J. V. Johnson and R. A. Yost. 1995. Trace determination of naringenin and hesperitin by tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1956-1959.
- Widjiati. 1997. Pengaruh fosfat, glukosa dan kombinasinya dalam medium kultur *in vitro* terhadap perkembangan embrio mencit. Tesis. IPB. Bogor.
- Widjiati, B. Prajogo E. W., T. Sardjito dan N. Harijani. 1998. Pengaruh *Gandarussa vulgaris Ness* terhadap kultur *in vitro* embrio mencit. *Media Kedokteran Hewan.* 14: 200-204.
- Yatim, W. 1991. *Biologi Modern-Biologi Sel*. Penerbit Torsito. Bandung.
- Zaneveld, L. J. D. and K. L. Polakoski. 1976. *Proteinase Inhibitor in Andrology in Human Semen and Fertility in Men*. CV Mosby. St. Louis. London.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jenis-jenis Medium yang Digunakan**Medium Kultur M₁₆**

| | μ l | gram/liter |
|--|---------|------------|
| 1. Nacl | | 5,333 |
| 2. KCl | | 0,356 |
| 3. CaCl ₂ 2H ₂ O | | 0,252 |
| 4. MgSO ₄ 7H ₂ O | | 0,293 |
| 5. NaHCO ₃ | | 2,101 |
| 6. Na Laktat 60% | 2840 | |
| 7. Na Piruvat | | 0,036 |
| 8. Glukosa | | 1,000 |
| 9. Bovine Serum Albumin | | 4,000 |
| 10. Penicillin | | 0,060 |
| 11. Streptomisin | | 0,050 |
| 12. Fenol Red | | 0,010 |
| 13. Aquabides | | 1L |

Medium Phosphat Buffer Saline

| | % | Gram/200 ml |
|-----------------|-----|-------------|
| 1. PBS Powder | | 1,92 |
| 2. Glukosa | | 0,20 |
| 3. Na Piruvat | | 0,0072 |
| 4. Penicillin | | 0,012 |
| 5. Streptomisin | | 0,010 |
| 6. BSA | 3,0 | |

Lampiran 2. Perhitungan Dosis Hesperitin

Diket.: BM Hesperidin: 610

BM Hesperitin: 302,3

Dosis Hesperidin yang optimum pada penelitian terdahulu (Prajogo dkk., 1997^b) adalah 125 mg/kg BB

Maka Dosis untuk Hesperitin mengacu penelitian terdahulu adalah:

$$= \frac{125}{610} \times 302,3 = 62 \text{ mg/kg BB}$$

Perlakuan dalam penelitian dibuat setengah dan dua kalinya, yaitu:

Dosis I : 31 mg/kg BB

Dosis II : 62 mg/kg BB

Dosis III : 124 mg/kg BB

Diasumsikan berat badan mencit rata-rata 20 g.

Dan volume ideal pemberian larutan per oral pada mencit adalah 0,5 ml.

Sehingga dosis Hesperitin menjadi:

$$\text{Dosis I} : 31 \times \frac{20}{1.000} = 0,62 \text{ mg/20 g BB/ekor}$$

$$\text{Dosis II} : 62 \times \frac{20}{1.000} = 1,24 \text{ mg/20 g BB/ekor}$$

$$\text{Dosis III} : 124 \times \frac{20}{1.000} = 2,48 \text{ mg/20 g BB/ekor}$$

Dosis I

$$\text{Dari } 0,5 \text{ ml/ekor} \longrightarrow \frac{31}{62} \times 0,5 \text{ ml} = 0,25 \text{ ml/ekor/hari}$$

Kebutuhan selama 52 hari untuk 15 ekor = 195 ml

Kebutuhan Hesperitin selama 52 hari untuk 15 ekor

$$= 52 \times 15 \times 0,62 \text{ mg} = 489,6 \text{ mg}$$

Dosis II

$$\text{Volume per ekor} = \frac{62}{31} \times 0,25 = 0,5 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan selama 52 hari untuk 15 ekor} = 390 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan Hesperitin selama 52 hari untuk 15 ekor} \\ = 52 \times 15 \times 1,24 \text{ mg} = 979,2 \text{ mg} \end{aligned}$$

Dosis III

$$\text{Volume per ekor} = \frac{124}{62} \times 0,5 = 1 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan selama 52 hari untuk 15 ekor} = 780 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan Hesperitin selama 52 hari untuk 15 ekor} \\ = 52 \times 15 \times 2,48 \text{ mg} = 1.958,4 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jumlah total kebutuhan untuk larutan Hesperitin:

$$\text{Hesperitin: } 489,6 + 978,2 + 1.958,4 = 2.427,2 \text{ mg}$$

$$\text{Volume : } 195 + 380 + 780 = 1.365 \text{ ml}$$

Persediaan untuk penelitian selama 52 hari disiapkan 1,5 kali dari jumlah kebutuhan:

$$\begin{aligned} \text{Hesperitin: } 1,5 \times 2.427,2 &= 2.640,8 \text{ mg} \\ &= 2,6408 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume : } 1,5 \times 1.365 &= 2.047,5 \text{ ml} \\ &= 2,0475 \text{ l} \end{aligned}$$

$$\text{CMC 1\%} \longrightarrow \frac{1 \text{ g CMC}}{100 \text{ ml}} = \frac{2.047,5}{100} \times 1 \text{ g} = 20,475 \text{ g}$$

Lampiran 3. Perhitungan Statistik**FISHER EXACT TEST**

Membandingkan perlakuan A dan B terhadap frekuensi (+) yang muncul/dihitung.

| Perlakuan | Frekuensi | | Jumlah |
|-----------|-----------|-------|--------|
| | (+) | (-) | |
| A | a | b | a + b |
| B | c | d | c + d |
| Jumlah | a + c | b + d | T |

H_0 = Frekuensi (+) pada perlakuan A tidak berbeda dengan perlakuan B.

H_1 = Frekuensi (+) pada perlakuan A berbeda dengan perlakuan B.

$$p = \frac{(a+b)! (c+d)! (a+c)! (b+d)!}{T! a! b! c! d!}$$

Penerimaan:

$p > 0,05 \longrightarrow H_0$ diterima \longrightarrow frekuensi (+) A dan B tidak berbeda nyata.

$p < 0,05 \longrightarrow H_1$ diterima \longrightarrow frekuensi (+) A dan B berbeda nyata.

| A | B | a | b | c | d | p | Dite- rima | Kesimpulan |
|--------------------|----|----|---|----|---|------|---------------|-------------|
| Fertilisasi | | | | | | | | |
| K | H1 | 10 | 0 | 9 | 1 | 0,5 | H_0 | Tdk berbeda |
| K | H2 | 10 | 0 | 9 | 1 | 0,5 | H_0 | Tdk berbeda |
| K | H3 | 10 | 0 | 10 | 0 | 1 | H_0 | Tdk berbeda |
| H1 | H2 | 9 | 1 | 9 | 1 | 1,11 | H_0 | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 9 | 1 | 10 | 0 | 0,5 | H_0 | Tdk berbeda |

| | | | | | | | | |
|----------------------|----|----|---|----|----|----------------------|----------------|-------------|
| H2 | H3 | 9 | 1 | 10 | 0 | 0,5 | H ₀ | Tdk berbeda |
| Satu Sel | | | | | | | | |
| K | H1 | 10 | 0 | 9 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H2 | 10 | 0 | 9 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H3 | 10 | 0 | 10 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H2 | 9 | 0 | 9 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 9 | 0 | 10 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H2 | H3 | 9 | 0 | 10 | 0 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| Dua Sel | | | | | | | | |
| K | H1 | 10 | 0 | 1 | 8 | $1,2 \cdot 10^{-4}$ | H ₁ | Berbeda |
| K | H2 | 10 | 0 | 3 | 6 | $3,09 \cdot 10^{-3}$ | H ₁ | Berbeda |
| K | H3 | 10 | 0 | 1 | 9 | $6,0 \cdot 10^{-5}$ | H ₁ | Berbeda |
| H1 | H2 | 1 | 8 | 3 | 6 | $2,47 \cdot 10^{-1}$ | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 1 | 8 | 1 | 9 | $5,26 \cdot 10^{-1}$ | H ₀ | Tdk berbeda |
| H2 | H3 | 3 | 6 | 1 | 9 | $2,17 \cdot 10^{-1}$ | H ₀ | Tdk berbeda |
| Empat Sel | | | | | | | | |
| K | H1 | 8 | 2 | 0 | 9 | $5,9 \cdot 10^{-4}$ | H ₁ | Berbeda |
| K | H2 | 8 | 2 | 0 | 9 | $5,9 \cdot 10^{-4}$ | H ₁ | Berbeda |
| K | H3 | 8 | 2 | 0 | 10 | $3,6 \cdot 10^{-4}$ | H ₁ | Berbeda |
| H1 | H2 | 0 | 9 | 0 | 9 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H2 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| Delapan Sel (Morula) | | | | | | | | |
| K | H1 | 4 | 6 | 0 | 9 | $5,42 \cdot 10^{-2}$ | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H2 | 4 | 6 | 0 | 9 | $5,42 \cdot 10^{-2}$ | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H3 | 4 | 6 | 0 | 10 | 1,30 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H2 | 0 | 9 | 0 | 9 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |

| | | | | | | | | |
|----------|----|---|----|---|----|---|----------------|-------------|
| H2 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| Blastula | | | | | | | | |
| K | H1 | 0 | 10 | 0 | 9 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H2 | 0 | 10 | 0 | 9 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| K | H3 | 0 | 10 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H2 | 0 | 9 | 0 | 9 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H1 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |
| H2 | H3 | 0 | 9 | 0 | 10 | 1 | H ₀ | Tdk berbeda |

Keterangan: K : Kontrol
H1 : Perlakuan Hesperitin dosis I
H2 : Perlakuan Hesperitin dosis II
H3 : Perlakuan Hesperitin dosis III