

SKRIPSI

**PENGARUH PAPARAN FRAKSI AIR *Citrus nobilis* Lour
TERHADAP ANGKA FERTILISASI MENCIT DENGAN
METODE FERTILISASI *In Vitro***



Oleh :

RADEN RORO WULAN OKTAVIA ARYAGUNA PUTRI

060610137

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**PENGARUH PAPARAN FRAKSI AIR *Citrus nobilis* Lour
TERHADAP ANGKA FERTILISASI MENCIT DENGAN
METODE FERTILISASI *In Vitro***

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

RADEN RORO WULAN OKTAVIA ARYAGUNA PUTRI

NIM 060610137

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Dr. Widjiati, M.Si, drh)

Pembimbing Pertama



(Dr. Diah Kusumawati, M.S. drh)

Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**PENGARUH PAPARAN FRAKSI AIR *Citrus nobilis* Lour
TERHADAP ANGKA FERTILISASI MENCIT DENGAN
METODE FERTILISASI *In Vitro***

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, Mei 2010

RADEN RORO WULAN OKTAVIA ARYAGUNA PUTRI
NIM 060610137

Telah dinilai pada seminar hasil penelitian

Tanggal : 12 Mei 2010

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Pudji Srianto, M.kes., drh
Sekretaris : Tatik Hernawati, M.Si., drh
Anggota : Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, M.S., drh
Pembimbing Utama : Dr. Widjiati, M.Si., drh
Pembimbing Serta : Dr. Diah Kusumawati, M.S., drh

Telah diuji pada

Tanggal : 26 Mei 2010

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

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

Anggota : Tatik Hernawati, M.Si., drh

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

Dr. Widjiati, M.Si., drh

Dr. Diah Kusumawati, M.S., 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
ON MICE FERTILIZATION RATE BY *In Vitro*
FERTILIZATION METHOD**

RADEN RORO WULAN OKTAVIA ARYAGUNA PUTRI

ABSTRACT

Hesperidin, limonene, citral, and methyl antranilate are the components of *Citrus nobilis* Lour peels. Based on the previous researches, *Citrus nobilis* Lour water fraction contains antifertility component. This component has inhibition effect of hyaluronidase enzyme produced by the acrosomal cap of spermatozoa. In this study, *Citrus nobilis* Lour water fraction was given with doses: 40 mg/kg BW; 60 mg/kg BW and 80mg/kg BW per oral daily to male mice for one spermatogenesis cycle (35 days). The effect of *Citrus nobilis* Lour water fraction on fertilization rate observed by IVF (*In Vitro Fertilization*) after 24 hours incubation. The fertilization happened when the ovum transformed into zygot, and if the fertilization did not happen, this transformed would not occurred and the granulose cells layer will stay intact. The result from IVF method after 24 hours incubation showed that granulose cells layer were still intact and the ovum were not transformed into zygot. Conclusion: the *Citrus nobilis* Lour water fraction doses 40 mg/kg BW; 60 mg/kg BW and 80mg/kg BW could decrease fertilization rate by IVF method with percentation 58%, 25%, and 0%. It means that *Citrus nobilis* Lour could also inhibits the penetration function of mice spermatozoa. But only the highest dose (80 mg/kg BW) could showed the absolute result or 100% ovum were still intact.

Key words : *Citrus nobilis* Lour, hesperidin, *in vitro* fertilization, fertilization rate

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Paparan Fraksi Air *Citrus Nobilis* Lour Terhadap Angka Fertilisasi Mencit Dengan Metode Fertilisasi *In Vitro*.**

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.

Dr. Widjiati, M.Si., Drh selaku dosen pembimbing pertama dan Dr. Diah Kusumawati, M.S., Drh selaku dosen pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesaikannya skripsi ini.

Dr. Pudji Srianto, M.Kes., Drh selaku ketua penguji skripsi, Tatik Hernawati, M.Si., Drh selaku sekretaris penguji skripsi, dan Dr. Ngakan Made Rai Widjaja, M.S., 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.

Rudy Sukanto Setiabudi, M.Sc., 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 orangtuaku Moh. Sjarif Hidayat, SH dan Eva Mustika Maulidia, B.sc, saudara-saudaraku mbak opi, mas firman, anggi, angga, ana, keluarga besar Moh. Hasin Effendi (Alm) dan Siti Sundari yang telah memberikan nasihat, motivasi, do'a dan dukungan baik material maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini.

Ariful Bahri atas kasih sayang dan dukungannya selama ini. Sahabat-sahabatku tercinta Theresia, Opik, Any, Nandari yang telah memberikan semangat dan motivasi hingga terselesainya skripsi ini. Teman-teman penelitian *Citrus* Viski, Ketut, Devi, Ratna, Mita, Anastasia terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini.

Teman-teman Fakultas Kedokteran Hewan angkatan 2006 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 PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Landasan Teori	5
1.4. Tujuan Penelitian	7
1.5. Manfaat Penelitian	7
1.6. Hipotesis Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. <i>Citrus nobilis</i> Lour	8
2.2. Sistem Reproduksi Jantan	10
2.2.1. Anatomi Fisiologi Reproduksi Jantan	10
2.2.2. Spermatozoa	11
2.3. Sistem Reproduksi Betina	13
2.3.1 Anatomi Fisiologi Reproduksi Betina	13
2.3.2 Sel telur	15
2.4 Fertilisasi <i>In Vitro</i>	16
2.5 Hewan Coba	17
BAB 3 METODE PENELITIAN	19
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.1.1. Tempat Penelitian	19
3.1.2. Waktu Penelitian	19
3.2. Bahan dan Materi Penelitian	19
3.2.1. Hewan Percobaan	19
3.2.2. Bahan Penelitian	19
3.2.3. Alat Penelitian	20

3.3. Metode Penelitian	20
3.3.1. Persiapan Hewan Coba	20
3.3.2. Pembuatan Fraksi air <i>Citrus nobilis</i> Lour	21
3.3.3. Perlakuan Terhadap Hewan Coba	22
3.3.4. Koleksi Sel Telur Mencit Betina	22
3.3.5. Pengamatan Angka Fertilisasi Dengan Metode Fertilisasi <i>In Vitro</i>	23
3.4. Rancangan Penelitian	24
3.5. Peubah yang Diamati	24
3.5.1. Jenis Peubah	24
3.5.2. Definisi Operasional	24
3.6. Analisis Data	25
3.7. Kerangka Penelitian	26
 BAB 4 HASIL PENELITIAN	 27
4.1. Hasil Pembuatan Fraksi Air <i>Citrus Nobilis</i> Lour	27
4.2. Hasil Pengamatan Angka Fertilisasi dengan Metode Fertilisasi <i>In Vitro</i>	27
4.3. Analisis Data Hasil Pengamatan Angka Fertilisasi	29
 BAB 5 PEMBAHASAN	 30
 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	 33
6.1. Kesimpulan	33
6.2. Saran	33
 RINGKASAN	 34
 DAFTAR PUSTAKA	 36
 LAMPIRAN	 39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Persentase jumlah sigot yang terbentuk setelah dilakukan fertilisasi <i>in vitro</i>	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. <i>Citrus nobilis</i> Lour	10
2.2. Spermatozoa mencit dengan pembesaran 1750x.....	13
2.3. Mencit (<i>Mus musculus</i>)	18
3.1. Skema alur kerja penelitian	26
4.1.(a) Sel telur yang terfertilisasi menjadi sigot	28
(b) Sel telur yang tetap utuh	28
4.2. Diagram batang hasil pengamatan angka fertilisasi	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan dosis	39
2. Komposisi media M16 (dalam g/L)	40
3. Perhitungan pengenceran hormon PMSG dan hCG	41
4. Perhitungan angka fertilisasi dengan metode <i>Chi Square</i>	42
5. Persentase jumlah sigot yang terbentuk setelah dilakukan fertilisasi <i>in vitro</i>	44
6. Foto-foto selama proses penelitian	45

DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

BB	: Berat Badan
BSA	: Bovine Serum Albumin
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
IU	: International Unit
IVF	: In Vitro Fertilization
KB	: Keluarga Berencana
LD ₅₀	: Lethal Dosis 50
M16	: Media Minimum 16
PBS	: Phosphate Buffer Saline
pH	: Power of Hydrogen
PMSG	: Pregnant Mare Serum Gonodotropin
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
SPSS	: Staistical Product and Service Solution
♀	: Betina
♂	: Jantan

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Peningkatan jumlah penduduk merupakan permasalahan yang perlu diperhatikan oleh pemerintah. Salah satu solusi untuk menekan laju peningkatan penduduk adalah dengan program Keluarga Berencana (KB). Ada beberapa cara KB modern yang dianjurkan oleh pemerintah yaitu dengan menggunakan pil, suntikan, kondom, sterilisasi wanita (tubektomi) dan sterilisasi pria (vasektomi). Ada juga KB tradisional yaitu dengan menggunakan pantang berkala, senggama terputus, pijat dan jamu. Namun pemilihan KB modern bukannya tanpa masalah terutama yang berhubungan dengan cara hormonal karena dapat menimbulkan efek samping seperti berat badan naik atau turun, sakit kepala, mual, tidak haid dan lain-lain (Winarno dan Sundari, 1997).

Menurut Fransworth dan Waller (1982) yang dikutip oleh Setiawan (2006) dibandingkan pengaturan fertilitas pada wanita, pengaturan fertilitas pada pria belum berhasil dengan baik. Karena yang dikendalikan bukan hanya satu sel melainkan jutaan sel spermatozoa dalam sekali ejakulasi. Untuk itu diusahakan cara kontrasepsi yang bersifat reversibel, dapat menghambat produksi spermatozoa sampai pada spermatozoa yang infertil, tidak menghambat potensi dan perilaku seksual, tidak ada efek samping terhadap sistem kardiovaskular, fungsi hati dan ginjal yang menjadi syarat metode KB yang ideal.

Keterlibatan kontrasepsi pada hewan jantan mengacu pada perkembangan penelitian bidang kontrasepsi dan program KB pria pada manusia saat ini. Dalam dunia kedokteran hewan, penggunaan kontrasepsi pada hewan lebih sering dimaksudkan untuk membuat hewan menjadi steril (mandul). Sterilisasi pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing dimaksudkan untuk mengontrol pertumbuhan populasi hewan tersebut dalam suatu lingkungan (Amanda, 2009). Sterilisasi pada hewan jantan memiliki banyak metode antara lain sterilisasi dengan pembedahan dan sterilisasi tanpa pembedahan. Sterilisasi dengan pembedahan dapat dilakukan dengan cara vasektomi atau kastrasi, sedangkan sterilisasi tanpa pembedahan biasanya menggunakan preparat hormon (Winarno dan Sundari, 1997).

Dalam pengembangan metode kontrasepsi pada hewan jantan, sebenarnya ada beberapa bagian pada proses reproduksi yang dapat dipengaruhi antara lain spermatogenesis, maturasi spermatozoa dalam epididimis, transportasi spermatozoa serta pelepasan atau fusi dua sel kelamin (gamet) untuk membentuk individu baru tersebut (Winarno dan Sundari, 1997).

Salah satu penelitian yang bisa dikembangkan adalah melalui pemanfaatan potensi sumber daya alam Indonesia yang sangat melimpah, diantaranya adalah tumbuhan. Salah satu tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia adalah tanaman jeruk. Spesies jeruk yang banyak dibudidayakan dan tingkat konsumsinya tinggi di Indonesia adalah *Citrus nobilis* Lour atau jeruk keprok (Ashari, 1995).

Menurut (Li, 2002) yang dikutip oleh Setiawan (2006) tingginya tingkat konsumsi buah jeruk ini mengakibatkan limbah yang tidak terpakai berupa kulit buah yang semakin menumpuk dan terbuang sia-sia karena dianggap tidak bermanfaat. Padahal dalam kulit buah *Citrus nobilis* Lour mengandung berbagai macam komponen yaitu vitamin A, vitamin B, vitamin C, hesperidin, limonene, citral, dan methyl antranilate. Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan *inhibitor* hialuronidase (Prajogo dkk, 1997).

Pada fertilisasi untuk mencapai inti sel ovum, sel spermatozoa harus dapat menembus beberapa lapisan antara lain *cumulus oophorus*; *zona pellucida*; dan *membrana vitellin* (Partodihardjo, 1992). Enzim hialuronidase yang terdapat pada *acrosomal cap* spermatozoa berfungsi untuk menembus *cumulus oophorus* sedangkan enzim akrosin untuk penetrasi *zona pellucida*. Masing-masing enzim tersebut bekerja secara individual, spesifik dan harus berurutan (Ismudiono dkk, 2007).

Apabila salah satu enzim tidak disekresikan maka aktivitas enzim yang lain akan terganggu sehingga fertilisasi tidak akan terjadi. Bila hialuronidase dihambat maka kemampuan sel spermatozoa mendispersi *cumulus oophorus* akan terganggu, yang akhirnya berakibat gagalnya fertilisasi (Zaneveld, 1976) yang dikutip oleh Setiawan (2006).

Hesperidin merupakan senyawa *inhibitor* hialuronidase tipe kompetitif reversibel dengan mekanisme reaksi enzimatik analog substrat. Pada mekanisme analog substrat ini, hesperidin terikat pada tempat aktif (*active*

site) hialuronidase yaitu glukosamin n-asetat (GlcNAc) , sehingga akan menghalangi *active site*-nya berikatan dengan substrat pada sel telur (Mentari, 2005).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, hesperidin dosis 100, 200 dan 300 mg/kg BB mencit dapat mencegah penetrasi spermatozoa dalam proses fertilisasi *in vitro* (Prajogo dkk, 1997). Pemberian fraksi air kulit buah *Citrus nobilis* Lour secara peroral dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB dapat menghambat aktivitas enzim hialuronidase yang mengakibatkan hambatan fungsi penetrasi spermatozoa mencit pada fertilisasi *in vitro* (Setiawan, 2006).

Dari penelitian yang telah dilakukan belum diketahui apakah pemberian fraksi air kulit buah *Citrus nobilis* Lour dapat menurunkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*. Penelitian Setiawan (2006) dilakukan pemeriksaan fungsi penetrasi dengan masa inkubasi lima jam ternyata belum menjamin bahwa tidak akan terjadi fertilisasi setelahnya karena umur kesuburan sel telur dan sel spermatozoa menurut (Ismudiono dkk,2007) dan (Partodihardjo, 1992) adalah sekitar 12-24 jam. Sehingga masih ada kemungkinan sel spermatozoa dapat menembus *cumulus oophorus* setelah inkubasi lima jam.

Pada penelitian Setiawan (2006) pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour dengan dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB memberikan efek hambatan fungsi penetrasi pada seluruh kelompok perlakuan sehingga belum diketahui dosis efisien yang dipakai sebagai dasar menentukan batas

pengaruh bahan tersebut. Oleh karena itu dilakukan eksplorasi dosis berdasarkan modifikasi dari penelitian yang pernah dilakukan untuk mendapatkan dosis efisien yang mampu menghambat terjadinya fertilisasi secara *in vitro*.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui pengaruh paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour terhadap angka fertilisasi mencit pada fertilisasi *in vitro* dengan masa inkubasi 24 jam.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan di atas, rumusan masalah yang timbul adalah apakah paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour per oral pada mencit jantan berpengaruh terhadap angka fertilisasi pada fertilisasi *in vitro* ?

1.3. Landasan Teori

Tanaman yang mengandung glikosida, flavonoid, dan triterpenoid mempunyai efek anti fertilitas yaitu dengan cara menghambat kerja enzim hialuronidase spermatozoa yang diperlukan dalam proses fertilisasi (Farnsworth and Waller, 1982). Pada kulit buah *Citrus nobilis* Lour terdapat bioflavonoid berupa hesperidin, vitamin A, vitamin B, vitamin C, limonene, citral dan methyl antranilate (Li, 2002). Hesperidin merupakan senyawa

glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan *inhibitor* hialuronidase (Prajogo dkk, 1997).

Pada proses fertilisasi untuk dapat mencapai inti sel ovum, spermatozoa harus dapat menembus: 1) segerombolan sel-sel granulosa yaitu *cumulus oophorus* yang membungkus sel ovum, 2) *zona pellucida* yang langsung membungkus sel ovum, 3) dinding sel ovum atau *membrana vittelin* (Partodiharjo, 1992)

Hialuronidase berfungsi untuk penetrasi pada *cumulus oophorus* dan akrosin untuk penetrasi pada *zona pellucida*. Masing-masing enzim tersebut bekerja secara individual, spesifik dan harus berurutan. Oleh karena itu jika salah satu enzim tidak disekresikan maka aktivitas enzim yang lain akan terganggu sehingga proses fertilisasi tidak akan terjadi (Ismudiono dkk, 2007).

Hialuronidase merupakan enzim yang terletak di *acrosomal cap* dari spermatozoa sebagian besar mamalia. Untuk dapat membuahi sel ovum, spermatozoa harus dapat terlebih dahulu menembus beberapa lapisan yang melapisi sel ovum. Lapisan tersebut tersusun atas matriks yang terdiri atas protein dan asam hyaluronat (Lauwers and Scharpe, 1997). Menurut Partodiharjo (1992), enzim hialuronidase dapat melunakkan hubungan antar sel granulosa yang mengandung asam hyaluronat, yaitu bahan perekat yang menyatukan sel-sel *cumulus oophorus* satu sama lain. Penghapusan materi perekat tersebut melepaskan hubungan antara sel-sel *cumulus oophorus* sehingga spermatozoa dapat menembus lapisan sel telur berikutnya. Apabila

enzim ini dihambat oleh hesperidin maka spermatozoa tidak dapat membuka matrik *cumulus oophorus* sehingga tidak terjadi fertilisasi.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour terhadap angka fertilisasi mencit pada proses fertilisasi *in vitro*.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai :

- 1) Sebagai alternatif pemanfaatan fraksi air *Citrus nobilis* Lour untuk memberikan pertimbangan pengembangan bahan kontrasepsi jantan.
- 2) Sebagai bahan penunjang referensi tentang penelitian *Citrus nobilis* Lour sebagai bahan kontrasepsi jantan.

1.6. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour per oral pada mencit jantan menurunkan angka fertilisasi pada fertilisasi *in vitro*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Citrus nobilis* Lour

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

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotylodinea
Sub kelas	: Dialypetalae
Ordo	: Rutales
Familia	: Rutaceae
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus nobilis</i> 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 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 *Poncitrustrioliata* 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.



Gambar 2.1. *Citrus nobilis* Lour. Sumber : //http.www.globalpinoy.com (8April 2009)

2.2. Sistem Reproduksi Jantan

2.2.1. Anatomi Fisiologi Reproduksi Jantan

Fungsi organ reproduksi pada jantan dapat dibagi menjadi tiga subdivisi utama : pertama, spermatogenesis, yang berarti hanya pembentukan sperma; kedua, kinerja kegiatan seksual pria; dan ketiga, pengaturan fungsi reproduksi pria oleh berbagai hormon. (Guyton and Hall, 1997).

Organ reproduksi jantan meliputi alat kelamin utama yaitu gonad atau 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. Pada keadaan normal testes berbentuk bulat panjang dengan sumbu vertikal. Testes terbungkus dalam kantong skrotum, dimana dalam skrotum berisi dua lobi testes yang masing-masing lobi mengandung satu testes. Testes sebagai organ kelamin utama memiliki dua fungsi yaitu fungsi reproduktif sebagai penghasil

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

Setelah terbentuk sempurna, spermatozoa memasuki lumen tubuli seminiferi. Dari sini, spermatozoa didorong kearah epididimis oleh bagian dinding tubuli seminiferi yang berkontraksi. Walaupun pada mulanya gerakannya lambat, spermatozoa mendapatkan kemampuan gerak penuhnya di dalam epididimis. (Sadler, 1997). Epididimis memiliki empat fungsi utama yaitu transportasi, konsentrasi, pendewasaan atau kapasitasasi dan tempat penyimpanan spermatozoa. Duktus (vas) deferens merupakan saluran yang menghubungkan cauda epididimis dengan urethra. Urethra merupakan saluran urogenitalis untuk menyalurkan urine dan semen (Ismudiono dkk, 2007).

Penis adalah genitalia luar jantan, untuk menyalurkan semen ke dalam tubuh betina. Terdiri dari tiga batang silinder jaringan yang erektil : dua batang corpora cavernosa sebelah atas, satu batang corpus spongiosum di bawah. Corpus spongiosum menyelaputi urethra. Kalau penis berereksi, darah memenuhi batang yang tiga buah itu sehingga keras atau tegang. Kulit pembungkus glans penis disebut prepuce (Yatim, 1994).

2.2.2. Spermatozoa

Ada 2 macam spermatozoa menurut strukturnya yaitu spermatozoa tak berflagelum dan berflagelum. Spermatozoa tak berflagelum terdapat pada beberapa jenis Evertebrata yakni Nematoda, Crustacea,

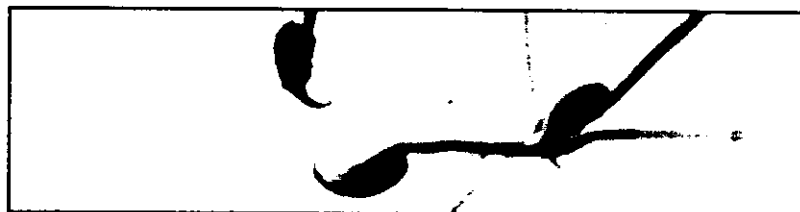
Diplopoda. Spermatozoa yang berflagelum umumnya terdapat pada hewan terdiri dari bagian kepala dan ekor. Kepala sebagai penerobos jalan menuju dan masuk ke dalam ovum dan membawa bahan genetik yang akan diwariskan kepada anak-cucu. Ekor untuk pergerakan menuju tempat pembuahan dan untuk mendorong kepala menerobos selaput ovum. Pada bagian kepala terdapat akrosom dan inti (Yatim, 1994).

Spermatogenesis adalah suatu proses pembentukan spermatozoa yang terdapat di dalam semua tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis terdiri dari dua fase yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis adalah pembentukan spermatosit primer dan sekunder dari spermatogonia tipe B melalui proses pembelahan mitosis yang dilanjutkan dengan pembelahan meiosis menjadi spermatid (Hafez, 1993).

Spermiogenesis merupakan serangkaian perubahan yang menimbulkan transformasi spermatid menjadi spermatozoa (Sadler, 1997). Menurut Poernomo dkk (2001) spermiogenesis ditandai dengan spermatid yang mengalami metamorfosis dan berubah bentuknya menjadi spermatozoa yang sempurna. Pada proses ini tidak terjadi pembelahan sel tetapi suatu proses dari transformasi sel yaitu aparat golgi menjadi tudung anterior atau akrosom, inti spermatid menjadi kepala sperma, dari sentriol keluar flagella (ekor), plasma membrane

menjadi selubung tubuh sperma dan mitokondria mengumpul di bagian ekor.

Enzim hialuronidase dan enzim proteolitik disimpan dalam jumlah besar di dalam akrosom spermatozoa. Saat ovum dikeluarkan dari folikel ovarium ke dalam rongga abdomen dan tuba fallopii, ovum membawa banyak lapisan sel-sel granulosa. Sebelum spermatozoa dapat membuahi ovum, spermatozoa akan melewati lapisan sel granulosa lalu menembus penutup tebal dari ovum yaitu *zona pellucida*. Pada proses ini enzim hialuronidase bekerja untuk membuka jalan di antara sel-sel granulosa sehingga dapat mencapai ovum (Guyton and Hall, 1997).



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

2.3. Sistem Reproduksi Betina

2.3.1. Anatomi Fisiologi Reproduksi Betina

Alat kelamin betina pada dasarnya dibagi menjadi dua bagian yaitu alat kelamin dalam dan alat kelamin luar. Alat kelamin dalam terdiri dari ovarium, tuba falopii, kornua uteri, korpus uteri, serviks dan

vagina. Sedangkan alat kelamin luar terdiri dari vulva, klitoris, vestibulum vaginae, dan kelenjar vestibulae. Pada mamalia ovarium terletak di dalam rongga pelvis dan terdiri dari dua buah serta memiliki bentuk yang bervariasi tergantung pada spesies hewan (Hardjopranjoto, 1995).

Ovarium merupakan organ yang memproduksi sel kelamin betina yang disebut sel telur atau ovum, dan hormon-hormon kelamin betina yaitu estrogen dan progesteron. Pada mamalia besar ukuran ovarium relatif kecil bila dibandingkan dengan besar tubuh, dan jumlah sel telur yang dihasilkan dalam satu kali periode pemasakan sedikit. Ovarium digantung oleh alat penggantung yang disebut mesovarium (Poernomo dkk, 2001).

Tuba falopii adalah saluran yang sempit dengan dinding berotot licin, berfungsi menerima atau menangkap sel telur (ovum) yang diovulasikan. Sel telur yang telah dibuahi akan diteruskan ke uterus sebagai akibat dari kontraksi dinding tuba. Tuba fallopii dibagi menjadi tiga yaitu infundibulum yang berada diujung menghadap ke ovarium, ampula yang menjadi tempat pembuahan, dan isthmus (Hardjopranjoto, 1995).

Uterus adalah saluran reproduksi hewan betina yang diperlukan untuk penerimaan ovum yang telah dibuahi, nutrisi dan perlindungan fetus. Umumnya uterus hewan terdiri dari sebuah korpus uteri, dua buah kornua, dan sebuah serviks. Serviks merupakan otot sphincter

yang terletak diantara uterus dan vagina. Vagina merupakan bagian saluran reproduksi betina yang memanjang dari mulut serviks bagian luar sampai tepat didepan dari muara urethra. Alat kelamin luar terdiri dari klitoris, vulva dan beberapa kelenjar yang berada pada vestibulum vulvae (Ismudiono dkk, 2007).

2.3.2. Sel Telur

Sejak embrio terbentuk, diikuti perkembangan fetus, dan setelah dilahirkan sampai masa dewasa, pada ovarium dari golongan mamalia akan terjadi proses pembentukan sel kelamin betina antara lain tahap proliferasi, tahap pertumbuhan, dan tahap pemasakan. Tahap proliferasi terjadi sebelum dilahirkan sampai beberapa saat setelah lahir. Sel kecambah membagi diri secara mitosis sehingga terbentuk oogonia. Oogonia selanjutnya mengalami pembelahan mitosis menjadi oosit primer (Baird, 1984).

Pada tahap pertumbuhan oosit akan terjadi secara periodik. Pada mencit segera setelah dilahirkan jumlah oosit diovarium kurang lebih ada 8000 dalam keadaan istirahat yang diseliputi oleh selapis sel folikel. Selanjutnya sel telur tumbuh secara penuh ditandai dengan pada sitoplasmanya bertambah dengan kuning telur, selaput sel telur (*zona pellucida*) berkembang, terjadi pertumbuhan yang pesat dari sel-sel folikel yang mengelilingi oosit pada akhir tahap ini (Hardjopranjoto, 1995).

Pertumbuhan lengkap sel telur pada mencit membutuhkan waktu 2 sampai 3 minggu dan waktu pertumbuhan sel telur pada mencit relatif lebih pendek dibanding dengan pertumbuhan sel telur pada hewan mamalia lain. Dalam perkembangannya, sel telur berada di dalam folikel. Sebuah folikel berasal dari oosit yang diseliputi oleh selapis sel pipih. Sel ini bertambah banyak secara mitosis dan berubah bentuknya menjadi kubus, disebut sel folikel sekunder, selanjutnya menjadi folikel tersier. Pada saat ini mulai dihasilkan cairan folikel dan disimpan dalam rongga folikel yang disebut antrum folikuli (Hardjopranjoto, 1995).

Ovulasi adalah suatu proses terlepasnya sel telur dari ovarium sebagai akibat pecahnya folikel yang telah masak (folikel de Graaf). Sel telur yang dilepaskan masih dalam keadaan diseliputi oleh sel granulosa. Waktu yang dibutuhkan oleh seluruh proses ovulasi tergantung kepada lokasi sel telur dalam folikel (Hardjopranjoto, 1995).

2.4. Fertilisasi *In Vitro*

Pada dasarnya fertilisasi *in vitro* tidak berbeda dengan fertilisasi *in vivo* yaitu satu proses peleburan antara ovum dan spermatozoa sehingga menghasilkan sel baru yang disebut dengan sigot (Hafez, 1993). Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan ovum maupun spermatozoa diluar tubuh hewan atau didalam

suatu bentuk sistem biakan sel. Awal penelitian tentang fertilisasi *in vitro* dimulai ketika M.C.Chang pada tahun 1959 berhasil mendapatkan anak kelinci yang berasal dari ovum yang dikumpulkan dari tuba falopii induk kelinci, kemudian dibuahi oleh spermatozoa dalam tabung dan embrio yang diperoleh ditransfer pada induk resipien (Hafez, 1993).

Proses fertilisasi *in vitro* agar berhasil membutuhkan ovum yang sudah matang dan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi. Selain itu juga memerlukan kondisi lingkungan menyerupai kondisi fertilisasi *in vivo* yang meliputi temperatur, media, pH, hormonal, nutrisi dan kondisi lain yang juga dapat mempengaruhi. Spermatozoa yang sudah mengalami kapasitasi memiliki kemampuan membuahi sel telur lebih tinggi dibanding yang belum mengalami kapasitasi. Perubahan-perubahan yang dialami spermatozoa dalam mendapatkan kekuatan untuk fertilisasi melibatkan enzim yang terdapat di kepala spermatozoa (Nalbandov, 1990).

2.5. Hewan Coba

Hewan coba yang akan digunakan dalam percobaan ini adalah mencit (*Mus musculus*). Mencit sering digunakan dalam penelitian biomedik modern. Mencit memiliki banyak varietas, ukurannya sesuai, subur, memiliki waktu penyediaan yang pendek dan mudah pemeliharaannya. (Arif, 2005). Menurut Sadler (1997), Pada mencit proses spermatogenesis berlangsung selama 34,5 hari yaitu delapan hari proses spermatositogenesis, meiosis lengkap diperkirakan 13 hari dan spermiogenesis kira-kira 13,5 hari.

Menurut Smith dan Mangkoewidjoyo (1998) yang dikutip oleh Zumaroh (2002) Mencit peka terhadap penyakit yang dialami manusia. Karena itu binatang itu sering digunakan di bidang genetika, imunologi, biologi seluler dan onkologi. Lama hidup mencit 1-2 tahun, ada yang mencapai tiga tahun. Umur dewasa 35 hari, kawin delapan minggu, berat dewasa 20-40 gram jantan dan betina 18-35 gram.



Gambar 2.3. Mencit (*Mus musculus*)
Sumber : Sancheti and Goyal (2002) // <http://www.rooj.com/Radioprotection.htm> (8 April 2009)

BAB 3

METODE PENELITIAN

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Botani Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, kandang hewan coba dan Laboratorium *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

3.1.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama sembilan bulan yaitu bulan Maret 2009 sampai dengan bulan November 2009.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) dari galur Balb C, sebanyak 40 ekor mencit jantan dan 40 ekor mencit betina. Mencit betina yang digunakan berumur dua sampai tiga bulan dengan rerata berat badan 20 gram. Mencit jantan yang digunakan berumur enam bulan dengan rerata berat badan 30 gram.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah fraksi air dari kulit buah *Citrus nobilis* Lour, yang diekstraksi di Laboratorium Botani Fakultas

Farmasi Universitas Airlangga. *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG), *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG), media M-16, alkohol 70%, larutan *Phosphate Buffer Saline*, *aquadest*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), Gentamisin Sulfat, *Mineral oil* (Sigma M8410), kertas *tissue* steril. Pakan mencit menggunakan pakan ayam, sekam untuk alas kandang dan botol air minum.

3.2.3. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini 5 buah kandang, mikroskop *inverted*, mikro pipet otomatis, pipet Pasteur, bunsen, *miliphore* 0.2 μm (whatman), *syringe* injeksi berbagai ukuran, jarum sonde, mortil, blender, kain *flanel*, *oven*, *inkubator* CO₂ yang dilengkapi pengatur suhu dan kelembaban, *llaminar flow*, selang *infuse*, *petridish* disposibel (nuclon), *erlenmeyer*, seperangkat alat bedah, *autoclave*.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang berupa mencit (*Mus musculus*) sebanyak 40 ekor mencit jantan dibagi dalam empat kelompok. Tiap kelompok terdiri dari sepuluh ekor yang dipilih secara acak (P₀, P₁, P₂, P₃) sementara itu 40 ekor mencit betina disiapkan untuk disuperovulasi dengan tujuan koleksi sel telur. Selama penelitian berlangsung hewan coba

diberi makan dan minum secara *ad libitum*, dan tiap lima hari sekali diganti sekam sebagai alas kandangnya.

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 mendapatkan perlakuan pada percobaan ini hanya mencit jantan yang sudah dibagi menjadi empat kelompok antara lain :

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 secara per-oral dengan dosis 40 mg/kg bb

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

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

Pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour secara per-oral menggunakan jarum sonde dilakukan selama satu kali siklus spermatogenesis yaitu 35 hari. Tiap harinya hewan coba disonde satu kali sebanyak 1 ml/ ekor. Pada hari ke 36 semua mencit jantan dibedah untuk diambil sperma dibagian cauda epididimis yang kemudian akan digunakan untuk fertilisasi *in vitro* (IVF). Perhitungan dosis dapat dilihat pada lampiran. 1.

3.3.4. Koleksi Sel Telur Mencit Betina

Sebelum dilakukan koleksi sel telur mencit betina disuperovulasi terlebih dahulu. Mencit disuntik hormon *Pregnant Mare Serum*

Gonadotropin (PMSG) dengan dosis 5 IU secara sub kutan. Selanjutnya 48 jam kemudian mencit disuntik dengan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dengan dosis 5 IU secara sub kutan dan langsung dikawinkan dengan mencit jantan yang sudah dikastrasi secara *monogami*. Setelah itu 17 jam kemudian mencit betina dibedah dan diambil bagian tuba falopiinya. Tuba falopii dicuci dengan larutan *Phosphate Buffer Saline*, kemudian dipindahkan pada petridish selanjutnya dilakukan *flushing* di bawah mikroskop *inverted* dengan merobek kantong fertilisasi (Widjiati dkk, 2002).

3.3.5. Pengamatan Angka fertilisasi Dengan Metode Fertilisasi *In Vitro*

Sel telur yang telah dipanen dicuci pada drop PBS sebanyak tiga kali kemudian dilanjutkan pada drop media M16 sebanyak tiga kali. Sel telur yang sudah mengalami pencucian tersebut kemudian dipindahkan ke media fertilisasi yaitu media kultur M16. Spermatozoa diambil dari cauda epididimis mencit jantan yang sudah diberi perlakuan dengan fraksi air *Citrus nobilis* Lour secara per-oral, kemudian dimasukkan kedalam media fertilisasi. Sel telur yang sudah bercampur spermatozoa kemudian diinkubasi didalam *inkubator* CO₂ 5% dengan suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan angka fertilisasi dengan melihat terbentuknya sigot menggunakan mikroskop *inverted*.

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan yang akan digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dalam rancangan ini hanya ada satu sumber keragaman yaitu perlakuan disamping pengaruh acak, sehingga hasil perbedaan antar perlakuan hanya disebabkan oleh pengaruh perlakuan dan pengaruh acak saja (Kusriningrum, 2008).

3.5. Peubah yang Diamati

3.5.1. Jenis Peubah

Peubah bebas pada penelitian ini yaitu fraksi air *Citrus nobilis* Lour yang diberikan dengan dosis 40 mg/kg BB; 60 mg/kg BB; 80 mg/kg BB per oral pada mencit jantan. Sedangkan peubah tidak bebas yaitu angka fertilisasi untuk melihat terbentuknya sigot. Peubah terkendali meliputi bahan dan alat penelitian, ruangan penelitian atau laboratorium, umur mencit, jenis kelamin mencit, pakan dan kandang mencit.

3.5.2. Definisi Operasional

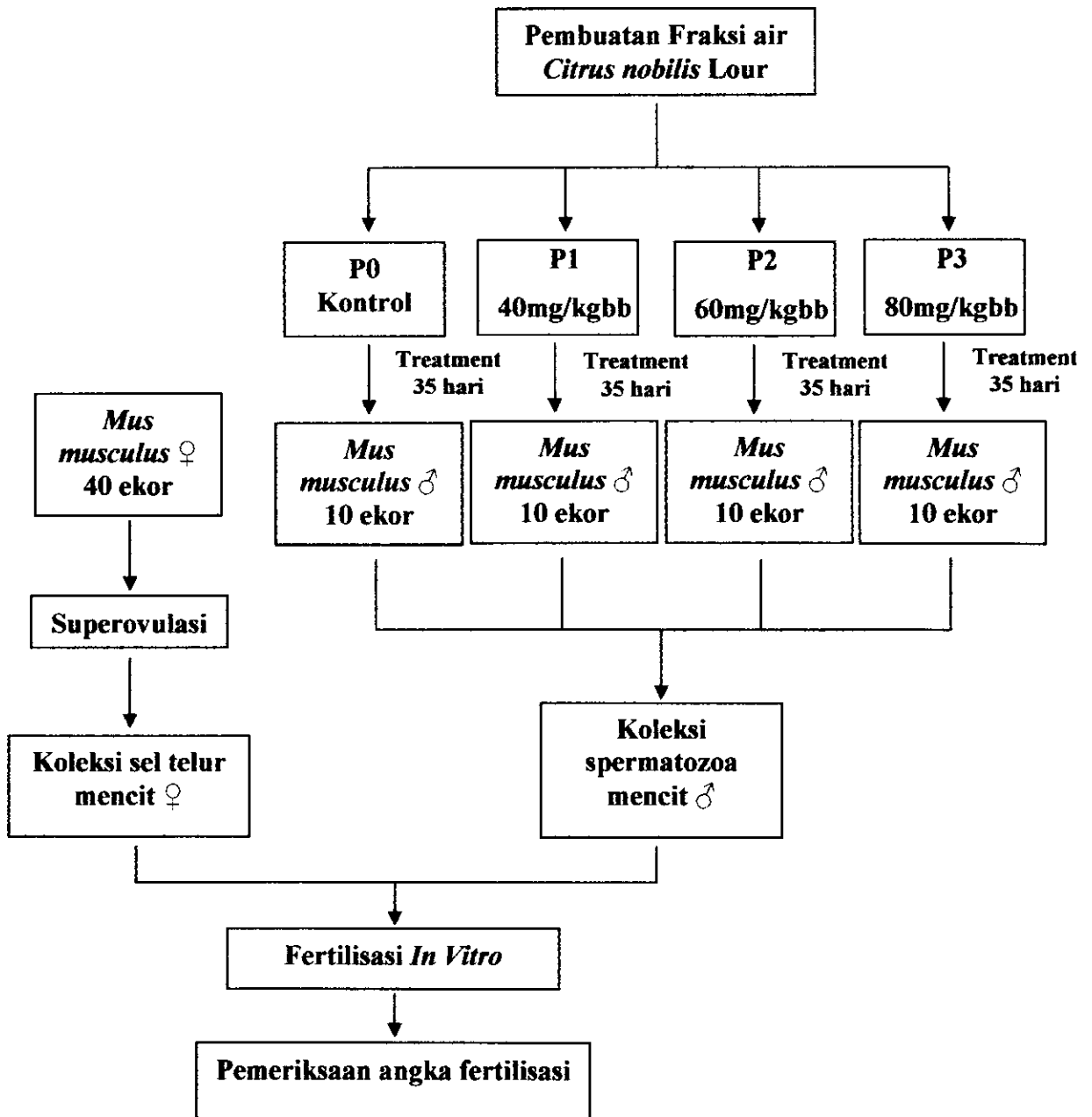
Fraksi air *Citrus nobilis* Lour merupakan hasil ekstraksi bertahap dari kulit buah jeruk keprok dengan menggunakan pelarut air. Fraksi air *Citrus nobilis* Lour yang didapat nantinya berupa ekstrak kering yang harus dibuat sediaan cair sebelum diberikan pada hewan coba.

Angka fertilisasi didapat dengan menghitung jumlah sigot dan sel telur yang tidak fertilisasi. Pada fertilisasi *in vitro* setelah inkubasi 24 jam, media M16 diamati dibawah mikroskop. Terjadinya fertilisasi ditandai dengan terbentuknya sigot dan bila tidak terjadi fertilisasi maka sel telur akan tetap utuh diselubungi oleh *cumulus oophorus*. Sel telur yang dihitung terfertilisasi menjadi sigot tidak memandang pada stadium apa pembelahannya

3.6. Analisis Data

Data yang dikumpulkan berupa jumlah sel telur yang fertilisasi menjadi sigot dan yang tidak fertilisasi menjadi sigot. Data yang dikumpulkan merupakan data nominal yaitu data yang hanya dapat digolongkan secara terpisah dan diperoleh dari hasil menghitung. Data yang diperoleh kemudian dihitung menggunakan uji *chi square* dan dianalisis secara deskriptif. *Level of significance* yang digunakan bertaraf 5% (Sugiono, 2009).

3.7. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1. Skema Alur Kerja Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1. Hasil Pembuatan Fraksi Air *Citrus nobilis* Lour

Sebagai bahan penelitian digunakan kulit buah *Citrus nobilis* Lour yang telah dikeringkan dan dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk seberat 600 gram. Hasil pembuatan fraksi air yang telah dilakukan dari 600 gram serbuk kulit buah *Citrus nobilis* Lour dihasilkan ekstrak kering seberat 40 gram .

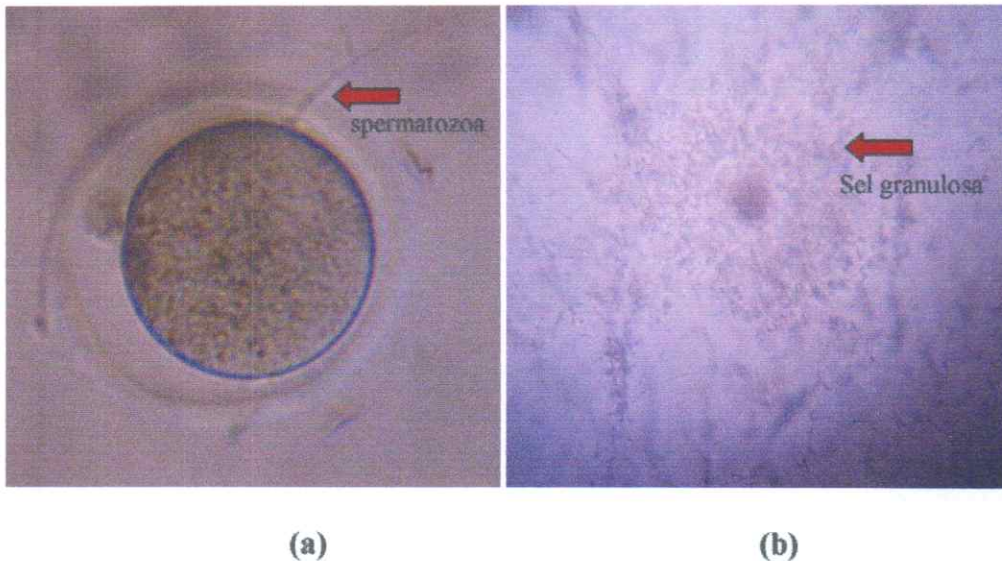
4.2. Hasil Pengamatan Angka fertilisasi dengan Metode Fertilisasi *In Vitro*

Setelah media drop diinkubasi hingga 24 jam lalu diperiksa dibawah mikroskop *inverted* banyaknya sel telur yang terfertilisasi menjadi sigot dan sel telur yang tidak fertilisasi. Pada kelompok kontrol (P0) yang hanya diberi *aquadest*, sel telur terfertilisasi dan seluruhnya menjadi sigot (100%) sedangkan pada kelompok uji dosis P1 40 mg/kg BB; P2 60 mg/kg BB; P3 80 mg/kg BB, sel telur yang terfertilisasi persentasenya berturut-turut 58%, 25% dan 0%. Data lebih lengkap dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 4.1. Persentase jumlah sigot yang terbentuk setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*

Perlakuan	Jumlah mencit ♂ (sebagai sumber spermatozoa)	Jumlah sel telur yang akan difertilisasi	Persentase sigot yang terbentuk
P0	6	42	(42) 100%
P1	6	95	(55) 58%
P2	6	131	(34) 25%
P3	6	18	(0) 0%

Pada pemeriksaan mikroskopis setelah inkubasi 24 jam, kelompok kontrol seluruh sel telur mengalami fertilisasi menjadi sigot sedangkan pada kelompok uji dosis tertinggi seluruh sel telur tetap utuh atau tidak fertilisasi.

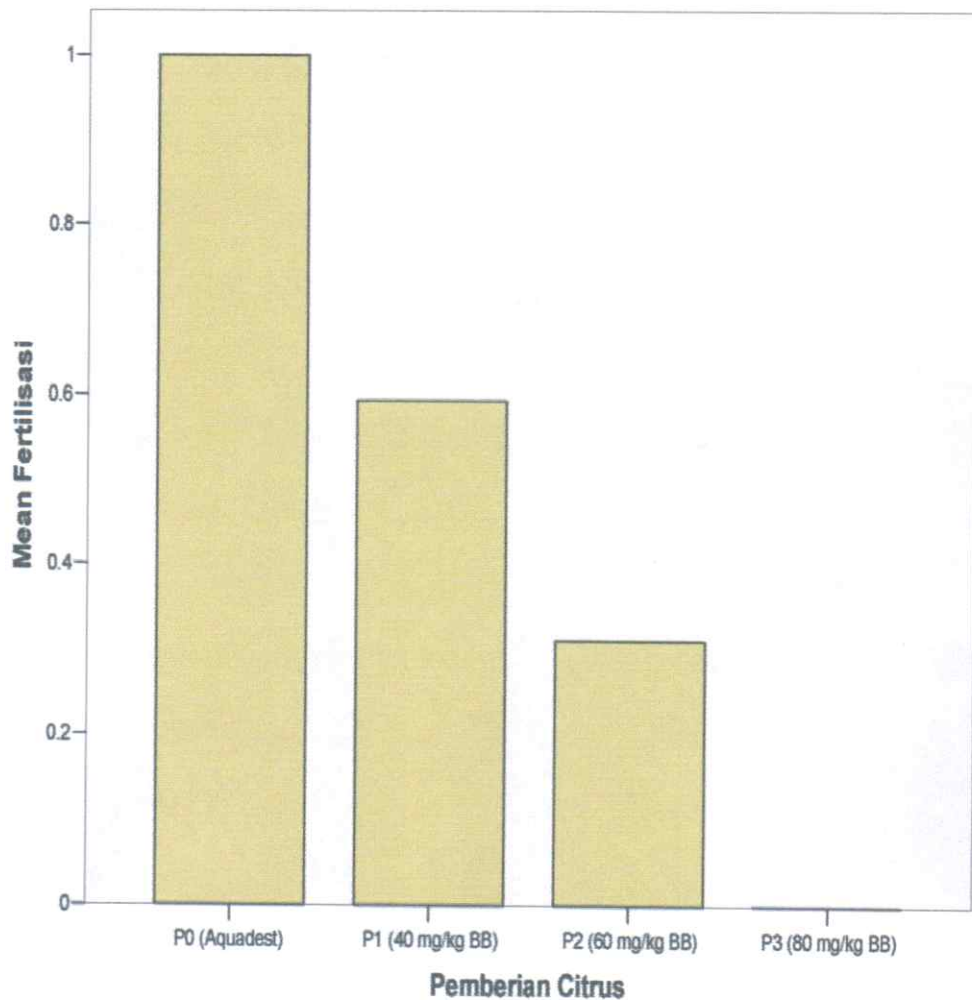


Gambar 4.1. a. Sel telur yang terfertilisasi menjadi sigot ; b. Sel telur yang tetap utuh (Perbesaran 100x)

Pada pemeriksaan angka fertilisasi menggunakan metode fertilisasi *in vitro*, sel telur yang mengalami fertilisasi (sigot) dan tidak mengalami fertilisasi (utuh) dihitung dan diolah menggunakan metode *chi square*. *Level of significance* yang digunakan adalah 5%. Hasil yang diperoleh menunjukkan perbedaan yang *significant* antar perlakuan dosis. Perhitungan lebih lengkap pada lampiran 4.

4.3. Analisis Data Hasil Pengamatan Angka fertilisasi

Hasil pengamatan angka fertilisasi menggunakan metode fertilisasi *in vitro* setelah inkubasi selama 24 jam dan dianalisa menggunakan *Chi square* pada SPSS dapat dilihat pada diagram sebagai berikut :



Gambar 4.2. Diagram batang hasil pengamatan angka fertilisasi

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Telah dilakukan penelitian pengaruh pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour dengan dosis 100 mg/kg BB; 200 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB untuk mengamati fungsi penetrasi spermatozoa dengan metode fertilisasi *in vitro* dengan masa inkubasi lima jam dan diperoleh data seluruh sel ovum mencit tidak mengalami penetrasi (100% tetap utuh). Dosis yang diberikan seluruhnya memberikan efek hambatan fungsi penetrasi yang mutlak sehingga pada penelitian ini dilakukan eksplorasi dosis lebih rendah yang masih mampu memberikan efek hambatan fungsi penetrasi dan penurunan angka fertilisasi.

Setelah dilakukan eksplorasi dosis, didapatkan tiga rentang dosis dibawah dosis terkecil dari penelitian Setiawan (2006) yaitu 100 mg/kg BB, dosis tersebut antara lain 40 mg/kg BB, 60 mg/kg BB, 80 mg/kg BB. Dosis dalam penelitian ini diharapkan mampu mencegah fertilisasi dan menurunkan angka fertilisasi. Sehingga dapat digunakan sebagai dosis efisien untuk pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour sebagai bahan alternatif kontrasepsi pada pejantan. Selain itu masa inkubasi pada fertilisasi *in vitro* diperpanjang menjadi 24 jam dengan tujuan untuk mengetahui apakah terjadi fertilisasi sampai akhir umur kesuburan dari sel spermatozoa dan sel telur.

Hasil pengamatan uji fertilisasi *in vitro* setelah inkubasi 24 jam untuk mengetahui angka fertilisasi, kelompok kontrol menunjukkan seluruh sel telur mengalami fertilisasi menjadi sigot dengan persentase 100%. Kelompok uji dosis

40 mg/kg BB, 60 mg/kg BB dan 80 mg/kg BB sel telur yang terfertilisasi persentasenya berturut-turut 58%, 25% dan 0%. Pada kelompok P1 dan P2 dengan pemberian dosis 40 mg/kg BB dan 60 mg/kg BB masih terdapat beberapa sel telur yang mengalami fertilisasi. Hal ini dapat disebabkan karena dosis fraksi air *Citrus nobilis* Lour yang diberikan belum mampu menghambat terjadinya fertilisasi secara keseluruhan sehingga masih terdapat sel spermatozoa yang mampu menembus lapisan sel-sel granulosa dari *cumulus oophorus*.

Pada kelompok P3 pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour dosis tertinggi yaitu 80 mg/kg BB seluruh sel telur tetap utuh, hal ini ditunjukkan dengan morfologi sel telur yang masih dilapisi oleh sel granulosa dari *cumulus oophorus*. Ketidakmampuan spermatozoa mencit dalam mendispersi lapisan *cumulus oophorus* merupakan akibat dari pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour yang memiliki sifat *inhibitor* hialuronidase.

Mekanisme fraksi air *Citrus nobilis* Lour yang mengandung hesperidin dalam menurunkan aktivitas dari hialuronidase merupakan jenis reaksi enzimatis analog substrat. Hal ini disebabkan karena hesperidin memiliki struktur kimia yang mengandung gugus gula, sebagaimana yang dimiliki oleh hialuronidase yaitu glukosamin n-asetat (GlcNAc). Hesperidin akan terikat pada tempat aktif (*active site*) GlcNAc, sehingga akan menghalangi GlcNAc untuk berikatan dengan asam hialuronat pada sel telur. Sehingga reaksi enzimatis dari hialuronidase dapat dihambat oleh keberadaan hesperidin sebagai senyawa *inhibitor* (Mentari, 2005).

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour secara per-oral pada mencit jantan dengan dosis 40 mg/kg BB, 60 mg/kg BB

dan 80 mg/kg BB dapat menurunkan angka fertilisasi dan secara tidak langsung juga dapat menghambat fungsi penetrasi sel spermatozoa. Karena apabila fungsi penetrasi dari sel spermatozoanya baik maka angka fertilisasi pun akan meningkat dan begitu pula sebaliknya. Pada penelitian ini hanya pemberian dosis tertinggi yaitu 80 mg/kg BB yang dapat menunjukkan efek antifertilitas hingga 100% sehingga dapat dijadikan sebagai dosis yang efisien pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour secara per-oral pada mencit jantan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour per oral dengan dosis 80 mg/kg BB pada mencit jantan menurunkan angka fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*.

6.2. Saran

1. Fraksi air *Citrus nobilis* Lour dapat digunakan sebagai pertimbangan pengembangan bahan alternatif kontrasepsi pada pejantan.
2. Jika ingin menggunakan Fraksi air *Citrus nobilis* Lour sebagai bahan kontrasepsi pada pejantan sebaiknya memperhatikan efek samping pada organ lainnya agar sesuai dengan syarat kontrasepsi yang ideal.
3. Pada pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour untuk mengetahui efek antifertilitas dapat digunakan dosis yang efisien pada mencit yaitu 80 mg/kg BB.

RINGKASAN

RINGKASAN

Spesies jeruk dengan tingkat konsumsi tinggi dan banyak dibudidayakan di Indonesia adalah *Citrus nobilis* Lour atau jeruk keprok. Pada kulit buah *Citrus nobilis* Lour terdapat bioflavonoid berupa hesperidin, vitamin A, vitamin B, vitamin C, limonene, citral dan methyl antranilate. Hesperidin merupakan senyawa glikosida flavonoid dan senyawa polifenol yang termasuk bahan *inhibitor* hialuronidase.

Hialuronidase merupakan enzim pertama yang disekresi pada proses penetrasi sel spermatozoa untuk mendispersi *cumulus oophorus* dari sel telur mencit. Jadi bila enzim hialuronidase dihambat maka kemampuan untuk mendispersi *cumulus oophorus* akan menurun dan pada akhirnya tidak akan terjadi penetrasi. Hal ini tentunya juga akan mengganggu proses fertilisasi. Mekanisme inilah yang dapat digunakan sebagai dasar pengembangan kontrasepsi pada hewan jantan.

Penelitian ini bertujuan ingin mengetahui pengaruh paparan fraksi air *Citrus nobilis* Lour per oral pada mencit jantan terhadap angka fertilisasi melalui proses fertilisasi *in vitro*. 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. Angka fertilisasi dilihat dari terbentuknya sigot setelah media fertilisasi diinkubasi selama 24 jam.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air *Citrus nobilis* Lour per oral pada mencit jantan dapat menurunkan angka fertilisasi pada proses

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Amanda, R. 2009. Kontrol Populasi Pada Anjing. <http://vet02ugm.wordpress.com/>
[1 September 2009]
- Arif, B. 2005. Efek Fasa Air Daun *Justicia gendarusa* Burm.f. Terhadap Fungsi Penetrasi Spermaozoa Mencit Dengan Metode Fertilisasi In Vitro. [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga. Surabaya
- Ashari, S. 1995. Hortikultura Aspek Budidaya. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta. Hal. 310-312
- Baird, D.T. 1984. The Ovary. In : Austin and Short Reproduction in Farm Animals. Book 3 Combridge Univ-press. pp. 91-114
- 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
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, D and Singla, A. K. 2001. Chemistry and pHarmacology of the *citrus* bioflavonoid hesperidin. *PHYtotherapy Research*, XV : 655-669
- 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
- Guyton, A. C and J.E. Hall. 1997. *Textbook of Medical PHysiology* 9th Ed. Dalam : *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Setiawan, I., (Ed). Alih bahasa: Setiawan I., Tengadi, dan A. Santoso. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal. 1265-1300
- Gyorgy and Szent, A. 2000. Hesperidin From *citrus* spp. <http://www.Symmcorp.com/info/hesperidin/htm>. [1 September 2009]
- Hafez, E. S. E. 1993. *Reproduction in Farm Animals* 6th. Ed. Lea and Febiger. PHiladelpHia. 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.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Cetakan pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 19-30

- Ismudiono., H. Anwar., P. Srianto., S. P. Madyawati., A. Samik dan E. Safitri. 2007. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Surabaya. Hal 79-82
- Kusriningrum. 2008. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Penerbit Dani Abadi. Surabaya. Hal 30-32
- Lauwers, A and S. Scharpe. 1997. PHarmacuetical Enzyme. Marcel Dekker Inc. New york. Pp. 155-161
- 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]
- Mentari, P. I. 2005. Hambatan Apigenin Dan Hesperidin Terhadap Aktivitas Hialuronidase EC 3.2.1.35 *In Vitro*. [Skripsi] Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. UI Press. Jakarta. Hal 247-266
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan. Jurusan Reproduksi. Institut Pertanian Bogor. Mutiara Sumber Widya. Jakarta. Hal 202-223
- Pinoy Gamot. 2009. Pinoy Health. //http.www.globalpinoy.com. [8 April 2009]
- Poernomo, B. S., Widjiati, E. M. Luqman, M Mafruchati dan Endang. 2001. Diktat Embriologi. Laboratorium Ilmu Mudigah. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 50-61
- Pracaya. 2000. Jeruk Manis : Varietas, Budidaya dan Pascapanen. Jakarta : Swadaya
- 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
- Robertson, H. 2004. *Citrus* (Orange, Lemon, Lime, Grapefruit, Naartjie genus). <http://www.museums.org.7a/bio/plants/rutaceae/citrus.htm>. [1 September 2009]

- Sadler, T. W. 1997. Embriologi Kedokteran Langman 7th Ed. Chapel Hill, North Carolina 11-19
- Sancheti .G.,and Goyal .P. K. 2002. Evaluation of Possible Radioprotective Action of *Rosmarinus officinalis L* in Swiss Albino Mice. <http://www.rooj.com/Radioprotection.htm> [8 April 2009]
- Setiawan D.A. 2006. Efek Fraksi Air Kulit Buah *Citrus nobilis* Lour Terhadap Fungsi Penetrasi Spermatozoa Mencit Dengan Metode Fertilisasi *In Vitro* . [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Sugiono. 2009. Statistik Non Parametris Untuk Penelitian. Penerbit CV Alfabeta. Bandung. Hal 81-84
- Tarmuzi K.A. 2002 .Pengaruh Hesperitin Terhadap Perkembangan Embrio Mencit Pada Kutur *In Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Kedoktersn Hewan Universitas Airlangga
- Widjiati, M. Mafruchati, B. Purnomo, E. Luqman dan H. A. Hermadi. 2002. Penggunaan sel-sel granulosa pada kultur *in vitro* embrio mencit tahap satu sel. Media Kedokteran Hewan. Vol. 14 No. 1. Hal. 1 – 7.
- Winarno .M W. dan D. Sundari. 1997. Informasi tanaman obat untuk kontrasepsi tradisional. Cermin Dunia Kedokteran. No.120. hal 25-28
- Yatim Wildan. 1994. Reproduksi dan Embriologi untuk Mahasiswa Biologi dan Kedokteran. Penerbit Tarsito. Bandung. Hal 31-43
- Zumaroh, A. 2002. Efek Pemberian Ekstrak Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Hambatan Penetrasi Spermatozoa Pada Kumulus Ooforus Mencit Dengan Metode Fertilisasi *In Vitro* (IVF). [Skripsi]. Fakultas Kedoktersn Hewan Universitas Airlangga

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 = $\frac{\text{dosis terbesar}}{\text{dosis terkecil}}$

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. Komposisi media M16 (dalam g/L)

1. NaCl	5,333
2. KCl	0,356
3. CaCl ₂ 2H ₂ O	0,252
4. KH ₂ PO ₄	0,162
5. MgSO ₄ 5H ₂ O	0,293
6. NaHCO ₃	2,101
7. Na Laktat 60%	2840 µl
8. Na Piruvat	0,036
9. Glukose	1,000
10. BSA	4,000
11. Penicillin	0,060
12. Streptomycin	0,050
13. Aqua Bidestilata	ad 1L

Indikator pH : Phenol Red (7,2-7,4)

Lampiran 3. Perhitungan pengenceran hormon PMSG dan hCG

Pengenceran hormon Folligon (PMSG) dan Chorulon (hCG)

1. Dosis PMSG yang digunakan 5 IU per ekor mencit

1 ampul (1000 IU) + 5 ml pelarut = 1000 IU dalam 5 ml

Ambil 1 ml = 200 IU, lalu + pelarut 3 ml menjadi 200 IU dalam 4 ml

Jadi 1 ml = 50 IU, karena per ekor mencit dosisnya 5 IU maka tiap ekor mencit disuntikkan PMSG sebanyak 0,1 ml.

2. Dosis hCG yang digunakan 5 IU per ekor mencit

1 ampul (1500 IU) + 5 ml pelarut = 1500 IU dalam 5 ml

Ambil 1 ml = 300 IU, lalu + pelarut 5 ml menjadi 300 IU dalam 6 ml

Jadi 1 ml = 50 IU, karena per ekor mencit dosisnya 5 IU maka tiap ekor mencit disuntikkan hCG sebanyak 0,1 ml.

Pemberian PMSG maupun hCG pada mencit disuntikkan secara sub kutan.

Lampiran 4. Perhitungan angka fertilisasi dengan metode *Chi Square*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Pemberian Citrus * Fertilisasi	287	84,7%	52	15,3%	339	100,0%

Pemberian Citrus * Fertilisasi Crosstabulation

			Fertilisasi		Total
			tidak fertilisasi	fertilisasi	
Pemberian Citrus	P0 (Aquadest)	Count	0	42	42
		Expected Count	22,8	19,2	42,0
		% of Total	,0%	14,6%	14,6%
	P1 (40 mg/kg BB)	Count	41	55	96
		Expected Count	52,2	43,8	96,0
		% of Total	14,3%	19,2%	33,4%
	P2 (60 mg/kg BB)	Count	97	34	131
		Expected Count	71,2	59,8	131,0
		% of Total	33,8%	11,8%	45,6%
	P3 (80 mg/kg BB)	Count	18	0	18
		Expected Count	9,8	8,2	18,0
		% of Total	6,3%	,0%	6,3%
Total	Count	156	131	287	
	Expected Count	156,0	131,0	287,0	
	% of Total	54,4%	45,6%	100,0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	90,851 ^a	3	,000
Likelihood Ratio	114,635	3	,000
Linear-by-Linear Association	89,207	1	,000
N of Valid Cases	287		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,22.

Perbandingan antara P1 dan P2

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Pemberian Citrus * Fertilisasi	226	66,7%	113	33,3%	339	100,0%

Pemberian Citrus * Fertilisasi Crosstabulation

			Fertilisasi		Total
			tidak fertilisasi	fertilisasi	
Pemberian Citrus	P1 (40 mg/kg BB)	Count	40	55	95
		Expected Count	57,6	37,4	95,0
		% of Total	17,7%	24,3%	42,0%
	P2 (60 mg/kg BB)	Count	97	34	131
		Expected Count	79,4	51,6	131,0
		% of Total	42,9%	15,0%	58,0%
Total		Count	137	89	226
		Expected Count	137,0	89,0	226,0
		% of Total	60,6%	39,4%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	23,533 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^a	22,214	1	,000		
Likelihood Ratio	23,695	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	23,429	1	,000		
N of Valid Cases	226				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 37,41.

Lampiran 5. Persentase jumlah sigot yang terbentuk setelah dilakukan fertilisasi *in vitro*

Perlakuan	Jumlah mencit ♂ (sebagai sumber spermatozoa)	Jumlah sel telur yang akan difertilisasi	Persentase sigot yang terbentuk
P0 (<i>aquadest</i>)	1	7	7
	1	7	7
	1	7	7
	1	7	7
	1	7	7
	1	7	7
Total	6	42	42 (100%)
P1 (40 mg/kg BB)	1	16	11
	1	15	3
	1	16	14
	1	16	11
	1	16	16
	1	16	0
Total	6	95	55 (58%)
P2 (60 mg/kg BB)	1	20	3
	1	31	3
	1	20	7
	1	20	7
	1	20	7
	1	20	7
Total	6	131	34 (25%)
P3 (80 mg/kg BB)	1	3	0
	1	3	0
	1	3	0
	1	3	0
	1	3	0
	1	3	0
Total	6	18	0 (0%)

Lampiran 6. Foto-foto selama proses penelitian



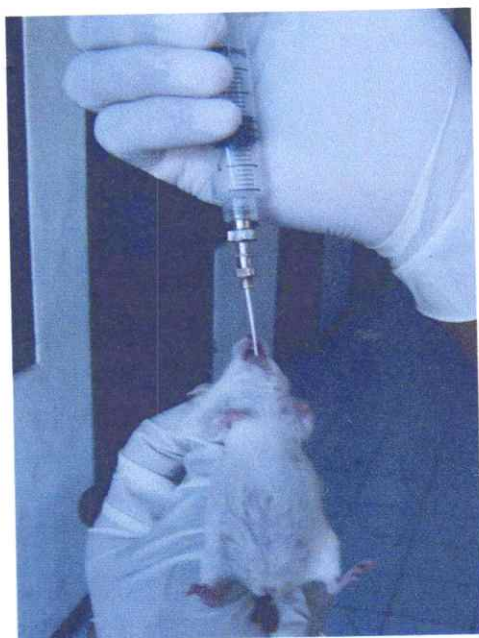
Gambar : Kantong fertilisasi tempat berkumpulnya sel telur yang akan dipanen



Gambar : Alat dan bahan yang digunakan pada proses fertilisasi *in vitro*



Gambar : Cara menyuntikkan PMSG dan hCG pada mencit betina secara subkutan



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