

# SKRIPSI

## **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK MENIRAN (*Phyllanthus niruri L*) TERHADAP SEKRESI TNF- $\alpha$ INTRATESTIKULER PADA MENCIT JANTAN (*Mus musculus*)**



OLEH :

**ANALIS WISNU WARDHANA**  
NGANJUK-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2004**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK MENIRAN ( *Phyllanthus niruri L* )  
TERHADAP SEKRESI TNF-  $\alpha$  INTRATESTIKULER  
PADA MENCIT JANTAN ( *Mus musculus* )**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

ANALIS WISNU WARDHANA

069912712

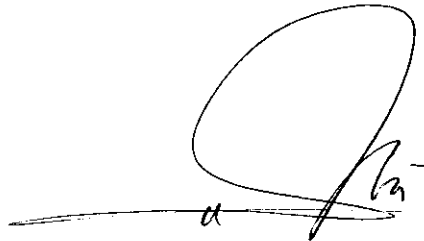
Menyetujui ,

Komisi Pembimbing,



---

Lilik Maslachah, MKes., drh  
Pembimbing Pertama



---

DR. Hardijanto, MS., drh  
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,



Moh. Sukmanadi, MKes., drh  
Ketua



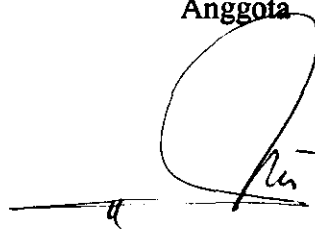
Hana Eliyani, MKes., drh  
Sekretaris



Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., drh  
Anggota



Lilik Maslachah, MKes., drh  
Anggota



DR. Hardijanto, MS., drh  
Anggota

Surabaya, 23 Agustus 2004

Fakultas Kedokteran Hewan,

Universitas Airlangga,

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., drh  
NIP. 130687297

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK MENIRAN (*Phyllanthus niruri L*)  
TERHADAP SEKRESI TNF- $\alpha$  INTRATESTIKULER PADA MENCIT  
JANTAN (*Mus musculus*)**

Analisis Wisnu Wardhana

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri L*) per-oral terhadap sekresi sitokin TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-Alpha*) intratestikuler pada mencit jantan (*Mus musculus*).

Hewan coba yang digunakan terdiri dari 27 ekor mencit jantan strain BALB/c berumur rata-rata 2,5 bulan dengan berat badan rata-rata 25 gram, yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol (P0) yang diberi 0,1 ml aquades, perlakuan I (P1) yang diberi 4 mg/0,1 ml ekstrak tanaman *Phyllanthus niruri L*, dan perlakuan II (P2) yang diberi 8 mg/0,1 ml ekstrak tanaman *Phyllanthus niruri L*.

Perlakuan tersebut diberikan setiap hari selama 54 hari dengan sonde dari spuit 1ml. Pada hari terakhir perlakuan, kelompok kontrol dan perlakuan diambil testisnya dan kemudian dilakukan pemeriksaan secara kuantitatif kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler dengan *indirect* ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Data yang diperoleh pada *indirect* ELISA dianalisis dengan uji F dan dilanjutkan dengan uji BNJ 5%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri L*) berpengaruh pada sekresi sitokin TNF- $\alpha$  intratestikuler pada mencit jantan (*Mus musculus*), yaitu pada dosis perlakuan I yang menunjukkan perbedaan nyata dengan P0 (kontrol) ( $P < 0,05$ ), sedangkan P2 dengan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ).

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Segala puji bagi Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya makalah yang berjudul “ Pengaruh Pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri L*) Terhadap Sekresi TNF- $\alpha$  Intratestikuler Pada Mencit Jantan (*Mus musculus*)” dapat terselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Tujuan dari penyusunan skripsi ini adalah untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung penyusunan skripsi ini tidak akan berhasil dengan baik. Dengan rasa hormat dan tulus ikhlas penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Lilik Maslachah, M.Kes., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Bapak DR. Hardijanto, MS., Drh. sebagai pembimbing kedua atas segala kesabaran dan keikhlasan dalam memberikan motivasi, bimbingan, arahan dan nasehat-nasehat yang sangat membantu dalam penulisan makalah seminar ini.

Dengan rasa hormat dan terima kasih yang sedalam-dalamnya juga penulis sampaikan kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, beserta staf atas pendidikan dan kesempatan yang telah diberikan.

2. Kepala Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner beserta staf, atas bantuan dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian.
3. Kepala Laboratorium Virologi beserta staf, atas bantuan dan fasilitas yang diberikan selama penelitian.
4. Tim DUE-LIKE, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti proyek penelitian.
5. Bapak dan Ibu tercinta serta adikku Lusia atas semua bantuan, dorongan semangat dan do'a restunya.
6. Kepala Laboratorium Anatomi Veteriner beserta staf, terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran, keikhlasan dan kesempatan yang telah diberikan.
7. Rekan-rekan ICI, Tony, Yongki, Yudha, Ahnu, Bobby, Kurniawan, Ida dan teman-teman angkatan '99, Kristina, Nuria, Sutrisna, Taufik, yang telah memberikan dukungan dan bantuan dengan ikhlas serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, yang disertai harapan agar skripsi ini bermanfaat bagi Ilmu Pengetahuan dan masyarakat.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan bagi kesempurnaannya.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Landasan Teori .....	3
1.4. Tujuan Penelitian .....	4
1.5. Manfaat Penelitian .....	5
1.6. Hipotesis Penelitian .....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1. Tinjauan Tanaman <i>Phyllanthus niruri L.</i> .....	6
2.1.1. Klasifikasi <i>Phyllanthus niruri L.</i> .....	6
2.1.2. Sinonira .....	6
2.1.3. Morfologi .....	7
2.1.4. Kegunaan Tanaman .....	8
2.1.5. Kandungan Tanaman .....	8
2.1.6. Pengaruh <i>Phyllanthus niruri L</i> Pada Sekresi TNF- $\alpha$ Intratestikuler .....	9
2.1.7. Mekanisme Kerja Obat .....	9

2.2. Sistem Imun .....	11
2.3. Sitokin.....	14
2.4. Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	15
2.5. Imunomodulator .....	17
2.6. Histologi Testis Mencit .....	17
2.7. Poros Hipotalamus-Hipofise-Testis.....	19
BAB III. MATERI DAN METODE .....	22
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	22
3.2. Materi Penelitian .....	22
3.2.1. Hewan Percobaan .....	22
3.2.2. Bahan Penelitian .....	23
3.2.3. Alat Penelitian .....	23
3.2.4. Kandang Penelitian .....	24
3.3. Metode Penelitian.....	24
3.3.1. Persiapan Hewan Percobaan .....	24
3.3.2. Perlakuan Hewan Percobaan .....	24
3.3.3. Pengambilan Sampel .....	25
3.3.4. <i>Indirect</i> ELISA.....	26
3.3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	27
3.4. Alur Penelitian.....	28
BAB IV. HASIL PENELITIAN .....	29
4.1. Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ Dengan <i>Indirect</i> ELISA .....	29
BABV. PEMBAHASAN.....	32
5.1. Tehnik Isolasi Sampel.....	32
5.2. Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ Dengan <i>Indirect</i> ELISA.....	32
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	36
6.1. Kesimpulan.....	36
6.2. Saran.....	36
RINGKASAN .....	37
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	43



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	6
2. Skema Alur Penelitian.....	28
3. Mikroplate ELISA yang Menunjukkan Hasil <i>Indirect</i> ELISA ...	29
4. Grafik Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$ Intratestikuler .....	31

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Nilai OD Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$ Intratestikuler Dengan <i>Indirect</i> ELISA .....	30
2. Hasil Analisis Data Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$ Intratestikuler...	30

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Bahan Uji <i>Indirect</i> ELISA .....	44
2. Pembuatan Ekstrak Meniran ( <i>Phyllanthus niruri L</i> ).....	45
3. Perhitungan Statistik Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$ Intratestikuler .....	47
4. Skema Alur Poros Hipotalamus-Hipofise-Testis .....	48
5. Penentuan Dosis Obat .....	49

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

*Phyllanthus niruri L.* telah digunakan dalam pengobatan tradisional di India, Cina, Filipina, Cuba, Nigeria dan Guam selama lebih dari 2000 tahun untuk berbagai penyakit antara lain penyakit kuning, *gonorrhoea*, menstruasi yang tidak teratur dan *diabetes*, serta digunakan secara topikal sebagai salep untuk ulsera, lesi pada kulit dan skabies. Tunas pada tanaman yang masih muda dijadikan bentuk infus dan digunakan untuk pengobatan disentri kronis (Anonimus, 1998).

Di Indonesia, tanaman *Phyllanthus niruri L.* dikenal dengan nama daerah *meniran* atau *meniran ijo* (Jawa), *memeniran* (Sunda) atau *gosau ma dung* (Ternate). Tanaman ini banyak tumbuh liar pada tempat yang lembab dan berbatu seperti di tepi jalan, tanah yang terlantar, di antara rerumputan tepi selokan dan tempat-tempat lainnya (Wijayakusuma, 2003).

Secara tradisional masyarakat Indonesia menggunakan ekstrak *Phyllanthus niruri L.* sebagai ramuan untuk obat sariawan mulut, meningkatkan pengeluaran air kencing (diuretik), mengobati diare, menambah nafsu makan, mengobati wasir dan varises. Secara ilmiah ekstrak ini terbukti memberikan efek penghambat terhadap pembentukan kristal kalsium oksalat sehingga dapat dijadikan obat alternatif penyakit kencing batu, sedangkan aktifitas anti hepatotoksik disebabkan oleh adanya kandungan kimia *Phyllanthin* dan *Hypophyllanthin* dan dari percobaan *in vitro*, tanaman ini menunjukkan

kemampuan sebagai antivirus *hepatitis B* (Mursito, 2003), disamping itu ekstrak air dari tanaman *Phyllanthus niruri L.* juga mampu meningkatkan titer antibodi pada ayam yang divaksin aktif *Newcastle Disease* (Rahmahani, 2000).

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L.* per-oral pada mencit mampu mempengaruhi fungsi dan aktifitas sistem imun yaitu sebagai imunostimulator. Hal ini ditunjukkan antara lain dengan adanya peningkatan aktivitas monosit atau makrofag pada fungsi fagositosis dan kemotaksis serta sekresi beberapa sitokin oleh sel-sel imunogenik. Salah satu sitokin tersebut adalah *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) yang disekresi oleh limfosit subset *T-helper-1* (Subset Th-1). TNF- $\alpha$  dapat mengaktifasi monosit atau makrofag untuk melepas *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6) dan TNF- $\alpha$  itu sendiri (Ma'at, 1997). Efek ini diperkirakan juga terjadi pada organ reproduksi, sebab pada testis TNF- $\alpha$  juga diproduksi oleh sel germinal jantan, juga oleh makrofag interstisial pada testis yang diduga mempunyai peran pada kontrol dari spermatogenesis (Pentikainen *et al.*, 2001).

Pada penelitian yang lain, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L.* per-oral dengan dosis 2 mg/0,1 ml, 4 mg/0,1 ml dan 8 mg/ 0,1 ml selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) telah terbukti mampu meningkatkan proses spermatogenesis pada mencit jantan, yang pada pengamatan histologik diwakili oleh peningkatan berat testis kiri, ukuran diameter dan tebal *tubulus seminiferus* serta jumlah sel spermatosit primer dan spermatid. Faktor yang diduga bertanggung jawab dalam peningkatan proses spermatogenesis tersebut adalah sitokin Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Sarno, 2000), sehingga perlu

dibuktikan secara kuantitatif sekresi TNF- $\alpha$  pada testis setelah diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri L.*

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, maka yang menjadi pokok permasalahan penelitian ini adalah apakah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L.* per-oral pada dosis 4mg/0,1ml dan 8mg/0,1ml selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) dapat mempengaruhi sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler pada mencit jantan (*Mus musculus*)?

## 1.3. Landasan Teori

Ekstrak *Phyllanthus niruri L.* secara ilmiah telah terbukti sebagai imunostimulator yang secara sistemik mampu mempengaruhi limfosit Th-1 untuk mensekresi TNF- $\alpha$  yang dapat merangsang monosit atau makrofag untuk mensekresi IL-1, IL-6 maupun TNF- $\alpha$  itu sendiri (Ma'at, 1997).

Dwight *et al.* (1990) menyatakan bahwa TNF- $\alpha$  mampu meningkatkan produksi testosteron pada testis tikus dewasa yang telah diuraikan jaringannya dan pada sel *Leydig* yang dimurnikan. Efek sitokin ini diduga karena pengaruhnya terhadap makrofag intratestikuler dan juga langsung pada sel *Leydig*.

Makrofag jaringan interstisial testis yang secara ultra struktural sama dengan makrofag sistemik juga mampu menghasilkan sitokin terutama TNF- $\alpha$ , IL-1 dan IL-6 yang mempengaruhi sel *Leydig*, sel *Sertoli* dan sel germinal

sehingga berpengaruh pada proses steroidogenesis dan spermatogenesis (Robertson *et al.*, 1993 ; Morrissette *et al.*, 1999).

Reseptor untuk TNF- $\alpha$  dideteksi terdapat di dalam sel somatik testis yaitu sel *Leydig* dan sel *Sertoli*. TNF- $\alpha$  mempunyai dua peran penting dalam mekanisme pengaturan hormonal dalam testis. Pada sel *Leydig* TNF- $\alpha$  menyebabkan *inhibisi Luteinizing Hormone* (LH) dengan menginduksi sintesis testosteron, sedangkan pada sel *Sertoli* menghambat *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dengan menginduksi sintesis *inhibin* (Benahmed, 1997).

Ekstrak *Phyllanthus niruri L* yang diberikan pada mencit jantan per-oral dengan dosis 4 mg/0,1ml dan 8 mg/0,1ml selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) terbukti mampu meningkatkan proses spermatogenesis yang diduga diakibatkan oleh meningkatnya sekresi TNF- $\alpha$  dan meningkatnya aktifitas monosit atau makrofag intratestikuler karena efek imunostimulator dari ekstrak *Phyllanthus niruri L* (Sarno, 2000).

TNF- $\alpha$  yang dihasilkan oleh sel germinal dan makrofag interstitial diduga mempunyai peran pada kontrol spermatogenesis. TNF- $\alpha$  merupakan salah satu faktor parakrin testis yang bersama hormon dari poros hipotalamus-hipofise-testis mengatur spermatogenesis (Pentikainen *et al.*, 2001).

#### 1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* per-oral selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) terhadap sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler (jumlah kuantitatif dari



TNF- $\alpha$ ) dalam hubungannya dengan peningkatan proses spermatogenesis pada mencit jantan (*Mus musculus*).

### **1.5. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menginformasikan bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri L* pada dosis tertentu dapat meningkatkan sekresi TNF- $\alpha$  yang berperan pada proses spermatogenesis mencit jantan. Informasi ini akan bermanfaat dalam pengembangan ilmu ataupun penelitian bidang reproduksi ternak.

### **1.6. Hipotesis Penelitian**

Hipotesis yang dapat diajukan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* per-oral pada mencit jantan (*Mus musculus*) dengan dosis 4 mg/0,1ml dan 8 mg/0,1ml selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) dapat mempengaruhi sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler.

## **BAB II**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tanaman *Phyllanthus niruri L*

##### 2.1.1. Klasifikasi *Phyllanthus niruri L*

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotylae
Sub kelas	: Monoclamidae/ Apetalae
Bangsa	: Euphorbiales
Suku ( familia )	: Euphorbiceae
Marga ( genus )	: <i>Phyllanthus</i> LINN
Jenis ( species )	: <i>Phyllanthus niruri</i> LINN

##### 2.1.2. Sinonim

Tanaman *Phyllanthus niruri L* dikenal dengan berbagai nama yaitu *Phyllanthus alatus*, *Phyllanthus cantonensis*, *Phyllanthus echinatuswall*, *Phyllanthus lepidocarpus*, *Phyllanthus leprocarpus*, *meniran / meniran ijo* (Jawa), *memeniran* (Sunda), *gosau ma dungi ruriha* (Temate), *Zhen zhu cao* (Sastrowidjojo, 2001). Wujud dari tanaman *Phyllanthus niruri L* bisa dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Tanaman *Phyllanthus niruri L.*

### 2.1.3. Morfologi

Perdu, tumbuh tegak, tinggi 50 cm sampai satu meter, bercabang terpenjar. Cabang mempunyai daun tunggal berseling dan tumbuh mendatar dari batang pokok. Batang berwarna hijau pucat dan hijau kemerahan. Daun berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, panjang daun 5 mm sampai 10 mm, lebar 2,5 mm sampai 5 mm, ujung bulat atau runcing dan permukaan bagian bawah berbintik-bintik. Bunga keluar dari ketiak daun, bunga jantan terletak di bawah ketiak daun, berkumpul 2-1 bunga, gagang bunga 0,5 – 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bulat telur terbalik, panjang 0,75 – 1 mm, berwarna pucat. Bunga betinanya letaknya di permukaan atas ketiak daun, gagang bunga 0,75 – 1 mm, helaian mahkota bunga berbentuk bulat telur sampai bulat memanjang, tepi berwarna hijau muda, panjang 1,25 – 2,5 mm. Buah bulat licin, garis tengah 2 - 2,5 mm, panjang gagang buah 1,5 – 2 mm (Wijayakusuma, 2003)

Ekologi penyebaran, tumbuh tersebar hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian tempat antara 1 – 1000 meter di atas permukaan laut. Tumbuh liar di tempat terbuka, pada tanah gembur yang mengandung pasir, di ladang, di tepi sungai dan di pantai.

Tanaman ini belum dibudidayakan secara teratur dan merupakan gulma yang tumbuh secara liar pada tempat yang lembab dan berbatu (Ma'at, 1997)

#### 2.1.4. Kegunaan tanaman

Ekstrak *Phyllanthus niruri L* telah banyak digunakan dalam pengobatan terhadap infeksi virus *hepatitis B*, pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* peroral pada mencit menunjukkan pengaruhnya pada fungsi dan aktivitas sistem imun yaitu sebagai imunostimulator (Ma'at 1997). Ekstrak *Phyllanthus niruri L* juga telah terbukti mampu meningkatkan proses spermatogenesis (Sarno, 2000).

#### 2.1.5. Kandungan tanaman

Kandungan kimia dari *Phyllanthus niruri L* dapat berupa *flavonoid* yang terdiri dari *guercetrin*, *quercitri*, *iso quercitrin*, *astragalin*, *rutin*, *kaempferol-4-rhamnopyranoside*, *erydictyol-7-rhamnopyranoside*, *festin-4-o-glucoside* dan *nirurin* ; *lignan* yang terdiri dari *Phyllantin* dan *hyphyllanthin*. *Alkaloid* yang diberi nama *ent-norcecurinin* (Ma'at 1997).

Terakhir diketemukan lagi *lignan* dan *isolignan* yang baru seperti : *linteralin*, *iso linteralin*, *nirteralin*, *nirphyllin* dan *phyllnirurin* (Sarno, 2000).

### 2.1.6. Pengaruh *Phyllanthus niruri L* pada sekresi TNF- $\alpha$ intratestikuler

Pemberian per-oral ekstrak *Phyllanthus niruri L* dapat meningkatkan aktifitas fagositosis dan kemotaksis *in vivo* monosit atau makrofag dan dapat meningkatkan sekresi TNF- $\alpha$  oleh subset T *helper* - 1, selanjutnya TNF- $\alpha$  dapat mengaktifasi komponen sistem imun monosit atau makrofag untuk melepas IL -1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  itu sendiri ( Ma'at, 1997 ), sehingga diperkirakan juga akan mempengaruhi aktifitas sel imunokompeten dalam testis terutama monosit atau makrofag yang mensekresi TNF- $\alpha$  dan diduga dapat mempengaruhi proses spermatogenesis.

### 2.1.7. Mekanisme Kerja Obat

Zat aktif yang terkandung didalam tanaman *Phyllanthus niruri L* yang diduga berperan sebagai imunostimulator adalah *phyllanthin* dan *flavonoid* (Ma'at, 1997). Senyawa yang bukan antigen (agen farmakologik seperti senyawa-senyawa bahan alam), biasanya akan berikatan dengan rantai karbohidrat dari protein transmembran pada permukaan sel T. Interaksi ini akan menimbulkan sinyal untuk aktifasi sel T-*helper* (Widyawaruyanti, 1999). *Phyllanthin* dan *flavonoid* disini bertindak sebagai ligan atau sinyal ekstra sel atau juga disebut sebagai *first messenger*, yang akan berikatan dengan reseptor transmembran yaitu reseptor terkait protein-G (Ma'at, 1997).

Transduksi sinyal melalui jenis reseptor terkait protein-G melibatkan tiga molekul terkait membran, yaitu reseptor itu sendiri, protein-G dan suatu molekul efektor. Istilah "protein-G" merupakan singkatan dari *Guanosin Binding Protein*

karena molekul ini dapat mengikat GDP (*Guanosin Diphospat*) atau GTP (*Guanosin Triphospat*). Protein-G terdiri dari tiga subunit :  $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$ . Dalam bentuk tidak aktif, subunit  $\alpha$  mengikat GDP, sedangkan dalam bentuk aktif akan mengikat GTP.

Transduksi sinyal terkait protein-G berlangsung sebagai berikut :

1. Bila reseptor mengikat ligan, reseptor akan teraktifasi dan akan mengikat protein-G
2. Setelah protein-G terikat, subunit  $\alpha$  melepas GDP dan mengikat GTP
3. Protein-G kemudian terlepas dari reseptor dan subunit  $\alpha$  yang sekarang mengikat GTP selanjutnya terlepas dari subunit  $\beta\gamma$
4. Subunit  $\alpha$  berdifusi menjauhi subunit  $\beta\gamma$  dan mengikat pada efektor PLC- $\gamma$  (alur PI)
5. PLC- $\gamma$  (*Phospolipase C- $\gamma$* ) akan menghasilkan dua *second messenger* yaitu IP3 (*Inositol triphospat*) yang akan memasuki sitosol dan DAG (*Diasil Gliserol*) yang masih tetap pada membran sel.
6. IP3 setelah memasuki sitosol akan ditangkap oleh reseptor IP3 yang terdapat pada retikulum endoplasma.
7. Reseptor IP3 adalah reseptor terkait saluran yang menyalurkan  $\text{Ca}^{++}$ . Reseptor ini akan terbuka bila mengikat ligannya dan melepas  $\text{Ca}^{++}$  masuk ke sitosol
8. Di sitosol,  $\text{Ca}^{++}$  akan mengikat suatu protein yang disebut kalmodulin.
9. Gabungan Ca-kalmodulin (Ca-Cam) akan mengaktifkan berbagai enzim, salah satunya adalah Ca-Cam-PK (*Calcium-Calmodulin Protein Kinase*).

10. Ca-Cam-PK selanjutnya mengaktifasi berbagai protein termasuk TNF- $\alpha$  (Suryohudoyo, 2000; Ma'at, 1997).

## 2.2 Sistem Imun

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

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

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



sel memori. Ketahanan tubuh yang diperoleh melalui sistem imun ini dinamakan imunitas spesifik / *acquired immunity* (Baratawidjaja, , 2000).

Imunitas natural spesifik terdiri dari : pertahanan anatomik (air liur, air mata, sekresi mukus), pertahanan fisiologis (pH lambung, lisozim, komplemen), pertahanan melalui fagositik / endositik (sel neutrofil, eosinofil, makrofag), pertahanan melalui respon inflamasi, sitotoksitas oleh sel *natural killer* (NK) dan mediator aktif yang larut seperti *interferon beta*, tumor nekrosis faktor yaitu suatu sitokin yang dilepas oleh makrofag.

Imunitas spesifik terdiri dari populasi limfosit T dan limfosit B bersama dengan sel penyaji antigen (*antigen presenting cell*).

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

Sistem limfosit B dan T ini meskipun dapat melakukan tugasnya secara terpisah, yang satu memproduksi antibodi sedangkan yang lain melepaskan limfokin (sitokin), namun mereka juga bekerjasama menghadapi antigen asing yang masuk tubuh. Sel monosit atau makrofag apabila telah memfagosit suatu antigen asing sebagai manifestasi proses imunitas non spesifik. maka pada waktu terjadi penghancuran intraseluler oleh beberapa enzim proteolitik, antigen tersebut akan dipresentasikan di permukaan monosit/ makrofag bersama molekul MHC dan akan dikenali oleh limfosit T melalui *T cell receptor* (TCR) sekaligus dipersiapkan untuk menjadi suatu super antigen, yaitu antigen yang sifat imunogeniknya bertambah besar. Langkah berikutnya adalah terjadinya kontak antara makrofag dengan limfosit T maupun limfosit B. Pada pertemuan ini terjadi presentasi super antigen, sehingga antigen itu segera dikenal oleh sistem imunitas yang spesifik sebagai antigen asing. Limfosit T jenis *helper cell* akan membantu limfosit B, sehingga lebih efektif dalam proses pengenalan zat antigenik tersebut. Limfosit B kemudian berkembang menjadi sel plasma yang akan mensintesis antibodi. Limfosit T jenis sitotoksik akan berdiferensiasi menjadi sel yang mampu mengadakan penyerangan ke organ target, sedangkan limfosit T yang lain berubah menjadi limfosit yang secara spesifik akan menghasilkan berbagai zat mediator imunitas seluler, yaitu zat limfokin (sitokin) (Tjokronegoro, 1999).

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

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

### 2.3. Sitokin

Lebih dari 100 jenis sitokin telah diketahui saat ini, menurut Baratawidjaja (2000) sitokin adalah mediator berupa peptida yang fungsinya dapat menurunkan atau meningkatkan respon imun inflamasi dan respon tubuh terhadap penyembuhan jaringan yang rusak. Sitokin merupakan *messenger* kimia atau perantara dalam komunikasi interseluler yang sangat poten, aktif pada kadar yang sangat rendah ( $10^{-10}$ - $10^{-15}$  mol/l) dan dapat merangsang sel sasaran.

Sitokin bekerja seperti hormon, yaitu melalui reseptor pada permukaan sel sasaran secara langsung atau tidak langsung. Secara langsung, sitokin bekerja lebih dari satu efek terhadap berbagai jenis sel (pleiotropik), bekerja secara autoregulasi (fungsi autokrin) atau bekerja terhadap sel yang letaknya tidak jauh (fungsi parakrin). Secara tidak langsung sitokin menginduksi ekspresi reseptor untuk sitokin lain atau bekerja sama dengan sitokin lain dalam merangsang sel (sinergisme) serta mencegah ekspresi reseptor atau produksi sitokin (antagonistik). Baratawidjaja (2000) juga menyebutkan bahwa sitokin berperanan

dalam banyak respon imun seperti aktivasi sel T, sel B, monosit dan makrofag, induksi sitotoksitas dan inflamasi.

#### 2.4. Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  adalah sitokin dengan berat molekul sebesar 26 Kda dan kemudian dipecah oleh TNF- $\alpha$  *Converting Enzyme* (TACE) sehingga menjadi protein dengan berat molekul 17,5 KDa (Anonimus, 2002). TNF- $\alpha$  terdiri dari 157 protein asam amino yang merupakan sitokin yang kuat dan mempunyai efek sitotoksik yang luas pada sel tumor dan target sel yang lain. TNF- $\alpha$  adalah perantara utama dalam sistem imun (Anonimus, 2003).

TNF dahulu dikenal dengan nama limfotoksin, tetapi sekarang TNF dibedakan menjadi TNF- $\alpha$  dan TNF- $\beta$  (limfotoksin). Sumber utama TNF- $\alpha$  adalah sel fagosit mononuklear yang diaktifasi dengan lipopolisakarida (LPS). Sumber yang lain adalah sel T yang dirangsang antigen, sel NK aktif dan sel *mast* aktif. TNF- $\alpha$  adalah suatu mediator untuk imunitas alami atau *natural* dan imunitas spesifik atau *acquired*, disamping itu juga merupakan mediator yang penting guna menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut. Pada dosis rendah (kurang lebih  $10^{-9}$  M) TNF- $\alpha$  bertindak sebagai regulator parakrin dan autokrin (Abbas, 1994).

TNF- $\alpha$  memiliki peran yang besar dalam aktifitas sistem imun, dibandingkan dengan sitokin yang lain, diantaranya berperan dalam sistem imun natural dan spesifik. Peran yang lain dari TNF- $\alpha$  adalah : (1) merangsang sel-sel endotel untuk mengekspresikan molekul *adhesi*, untuk mendukung proses

kemotaksis sel-sel inflamasi . (2) mengaktifasi sel-sel inflamasi. (3) merangsang sel-sel lain untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I, guna mendukung fungsi sel T sitotoksik (Gallin, 1989).

Menurut Dwight *et al.*, (1990) bahwa TNF- $\alpha$  adalah sitokin yang kuat dan diproduksi terutama oleh makrofag, TNF- $\alpha$  mempunyai sejumlah fungsi biologis yaitu nekrosis hemorrhagis pada tumor yang ditransplantasikan, sitotoksitas, peran yang penting dalam syok endotoksik dan pada inflamasi, pengaturan imun, proliferasi dan respon anti viral.

Menurut Mealy *et al* (1990) TNF- $\alpha$  adalah sitokin yang bertindak sebagai mediator dari banyak respon imun setelah terjadinya endotoksemia, septikemia dan kerusakan jaringan.

TNF- $\alpha$  merupakan suatu sitokin pleiotropik yang mempunyai efek seluler yang luas, termasuk respon inflamasi dan pengaturan imun. Di dalam testis, TNF- $\alpha$  diproduksi oleh sel germinal jantan dan oleh makrofag interstitial dari testis tikus dan mencit. TNF- $\alpha$  diduga merupakan salah satu faktor parakrin testis yang bersama dengan hormon dari poros hipotalamus-hipofise-testis diduga mempunyai peran pada kontrol spermatogenesis (Pentikainen *et al.*, 1999).

TNF- $\alpha$  dan IL-1 merangsang sekresi testosteron, baik pada testis yang digerus dan juga pada sel *Leydig* yang dimurnikan. TNF- $\alpha$  dan IL-1 juga menambah rangsangan maksimal pada sekresi testosteron (Warren *et al.*, 1990).

## 2.5. Imunomodulator

Imunomodulasi yaitu cara untuk mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan. Sedangkan imunomodulator adalah obat-obatan yang secara langsung memodulasi fungsi imun, mempunyai efek positif yang mampu meningkatkan fungsi dan aktifitas komponen sistem imun atau efek negatif yang mampu menekan fungsi dan aktifitas komponen sistem imun. Berdasarkan mekanisme kerjanya imunomodulator dibagi menjadi :

- a) **Imunostimulator**, yaitu bahan-bahan yang dapat meningkatkan fungsi dan aktifitas sistem imun.
- b) **Imunosupresor**, yaitu bahan-bahan yang dapat menekan fungsi dan aktifitas sistem imun normal atau sistem imun yang terganggu (Baratawidjaja, 2000).

## 2.6. Histologi Testis Mencit

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

Testis berada di dalam skrotum, dimana skrotum ini berperan penting dalam mempertahankan suhu testis agar tetap berada di bawah suhu tubuh,

kondisi ini diperlukan agar proses spermatogenesis berjalan normal (Thwaites and Hannan, 1989).

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

Testis dibungkus oleh tiga lapisan yaitu tunika vaginalis yang dibangun oleh satu mesotelium yang duduk di suatu membrana basalis, memisahkan tunika vaginalis dengan lapisan yang lebih tebal dan letaknya di tengah dinamakan tunika albugenia. Tunika albugenia terdiri dari jaringan fibroblas dan sel otot polos. Lapisan bagian dalam testis adalah tunika vaskulosa yang memiliki banyak pembuluh darah.

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

Ruangan diantara sel spermatogenik terisi oleh sel *Sertoli* yang mempunyai bentuk dasar kolumnar dengan prosesus apikal dan lateral, berinti *ovoid* atau *triangular*. Sel Sertoli yang berdekatan dihubungkan oleh *tight*

*junction* dan *gap junction*, dimana kompleks *junction* ini membentuk *blood testis barrier* yang melindungi sel germinal yang sedang berkembang dan mencegah masuknya produk aktifitas spermatogenesis ke dalam tubuh yang dapat membangkitkan respon imun (Ganong, 1993).

Testis sendiri tersusun atas banyak bentukan seperti pipa atau saluran halus yang berjalan berlekuk-lekuk, dengan kedua muaranya berhubungan dengan *rete testis* melalui *tubuli recti*. Pipa-pipa kecil tersebut disebut *tubuli seminiferi*, yang merupakan saluran atau pipa halus berkelok-kelok yang mengisi lebih dari 90 % dari massa testis (Ferdinandus, 1980).

Di dalam *tubulus seminiferus* terdapat berbagai macam sel germinal misalnya spermatogonium, spermatosit primer dan sekunder, spermatid serta spermatozoa. Disamping itu terdapat pula sel *Sertoli* yang mempunyai peranan penting untuk memberi nutrisi, proteksi dan hormonal terhadap sel germinal (Johnson and Everitt, 1998). Semua *tubulus seminiferus* bermuara ke satu arah dan berkumpul membentuk *rete testis* di daerah *mediastinum*. *Rete testis* melanjutkan diri ke *ductus efferent* kemudian ke *mediastinum* bagian *dorsal* untuk membentuk *caput epididimis* (Dellman dan Brown, 1992).

## 2.7. Poros hipotalamus – hipofise – testis

Hipotalamus yang mensekresi *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) mempunyai peranan penting dalam merangsang hipofise anterior untuk memproduksi gonadotropin yaitu *Follicle Stimulating Hormone* dan *Leutenizing Hormone* (FSH dan LH), yang targetnya adalah sel *Sertoli*, sel germinal serta



*tubulus seminiferus*. Selanjutnya FSH merangsang sel *Sertoli* untuk mengaktifkan enzim *Adenylsiklase* yang merubah *Adenosin TriPhospat* (ATP) menjadi 3'5' siklik *Adenosin MonoPhospat* (cAMP), dimana cAMP ini merangsang pembentukan *Androgen Binding Protein* (ABP) yang berfungsi sebagai alat transportasi hormon androgen di dalam *tubulus seminiferus*. FSH menstimulasi sel germinal agar lebih sensitif terhadap androgen, interaksi hormon androgen, sel germinal dan sel *Sertoli* sangat diperlukan guna berlangsungnya proses spermatogenesis (Ganong, 1993). Peranan lain dari hormon FSH adalah meningkatkan sintesis glikoprotein pada permukaan sel sehingga berperan dalam *adhesi* antar sel *Sertoli*, meningkatkan jumlah reseptor androgen dalam sel *Sertoli* dan membantu LH meningkatkan biosintesis androgen dalam sel *Leydig* (Hadley, 1992). FSH juga berperan pada proses spermatogenesis yaitu sejak terjadinya proliferasi spermatogonia hingga terbentuknya spermatosit primer (Maekawa *et al.*, 1995) dan terhadap perkembangan tahap akhir spermatid menjadi spermatozoa (Ganong, 1993).

Sel *Sertoli* mensekresi *inhibin* yang berperan sebagai umpan balik negatif terhadap produksi FSH. *Inhibin* adalah Protein yang larut dalam air, bebas dari estrogen dan testosteron (*non-steroid*) dengan berat molekul 10.000 Da. *Inhibin* menghambat FSH baik secara langsung atau tidak (penurunan sekresi ABP oleh sel *Sertoli*) dapat mempengaruhi proses spermatogenesis, sedangkan LH dibutuhkan untuk merangsang sel *Leydig* dalam jaringan interstisial testis dalam pembentukan hormon *steroid* misal : testosteron yang diperlukan dalam kelangsungan proses spermatogenesis. Sekresi LH ke dalam sirkulasi oleh

kelenjar hipofise anterior dapat dihambat oleh adanya umpan balik negatif testosteron baik secara langsung pada hipofise anterior maupun pada sekresi GnRH oleh hipotalamus (Ganong, 1993). Skema alur poros hipotalamus-hipofise-testis terdapat pada lampiran 4.

# **BAB III**

## **MATERI DAN METODE**

## BAB III

### MATERI DAN METODE

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama tujuh bulan, mulai bulan September 2003 sampai dengan bulan Maret 2004. Tahap perlakuan bertempat di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Tahap pemeriksaan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Tropical Disease and Research Center ( TDRC ) Universitas Airlangga dan Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### 3.2. Materi Penelitian

##### 3.2.1 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan ( *Mus musculus* ) dewasa *strain* BALB/c yang berumur dua bulan dengan berat badan rata-rata 25 gram sebanyak 27 ekor. Mencit tersebut diperoleh dan dipelihara di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak *Phyllanthus niruri L.* yang diperoleh dari Laboratorium Tradimun Gresik, dengan dosis 4 mg / 0,1 ml dan 8 mg / 0,1 ml yang telah diuji di Laboratorium Botani Farmasi – Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya (Ma'at, 1997) (cara pembuatan ekstrak pada lampiran 2), alkohol 70 % sebagai desinfektan, pakan mencit menggunakan *pellet ayam layer* tipe 524 produksi PT. Charoen Pokphand Sidoarjo. Bahan – bahan untuk *indirect* ELISA adalah : sampel berupa testis kiri yang telah digerus dan disentrifus serta diambil supernatannya, konjugat " *rabbit anti- mouse*", *anti – mouse* TNF- $\alpha$ , *substrat* AP (4 – NPP ph 9,8), NaOH 3 N, *Phospat Buffer Saline* (PBS), *PBS-Tween*, *carbonat buffer*, *washing buffer* dan *blocking buffer* (cara pembuatan *buffer* tercantum pada lampiran I).

### 3.2.3 Alat Penelitian

Penelitian ini pada tahap perlakuan dan isolasi menggunakan alat Sonde lambung, timbangan, gunting, pinset, skalpel dan sentrifus. Alat yang digunakan untuk tahap pemeriksaan adalah : lemari es, *Freezer*, *ELISA reader*, pencatat waktu ( *timer* ), tabung sentrifus, mikropipet *multichannel*, pipet *tip*, *eppendorf tube* 10  $\mu$ l, cawan petri, *mikroplate* ELISA, *washing dish*, rak, tabung *Erlenmeyer*, gelas ukur 500 ml, *aluminium foil*, dan *vortex*.

### **3.2.4 Kandang Penelitian**

Kandang untuk mencit pada penelitian ini terbuat dari kotak plastik berbentuk persegi panjang dengan ukuran 30 x 50 x 15 cm, yang beralaskan sekam dan ditutup dengan kawat dan disediakan sebanyak tiga buah. Sebelum digunakan, kandang didesinfeksi dengan cara disemprot dengan larutan alkohol 70 %, sedangkan sekam dioven pada suhu 160°C selama dua jam dan disimpan dalam tempat yang rapat sebelum digunakan. Kandang dibersihkan setiap tiga hari sekali dan sekam diganti dengan yang baru, minuman untuk mencit diberikan *ad libitum*, sedangkan pakan diberikan sebanyak 5 gram setiap ekor mencit per-hari.

## **3.3. Metode Penelitian**

### **3.3.1. Persiapan Hewan Percobaan**

Penelitian ini menggunakan 27 ekor mencit yang dibagi secara acak dalam tiga kelompok perlakuan yang masing – masing terdiri dari sembilan ulangan. Semua dimasukkan dalam kandang yang telah disiapkan. Sebelum diberikan perlakuan, mencit tersebut harus diadaptasikan untuk hidup bersama dalam satu kandang masing – masing selama satu minggu, kalau dijumpai satu mencit yang agresif, segera diganti dengan yang baru yang diambil secara random.

### **3.3.2. Perlakuan Hewan Percobaan**

Pemberian plasebo berupa aquades maupun ekstrak *Phyllanthus niruri L* dilakukan selama 54 hari ( satu setengah siklus spermatogenesis ) dan diberikan

pada pagi hari. Ekstrak *Phyllanthus niruri L* sebelum dihisap ke dalam spuit dikocok hingga homogen, dosis yang disediakan untuk perlakuan adalah 4 mg/ 0,1 ml per-hari, 8 mg/ 0,1 ml per-hari (cara penentuan dosis pada lampiran 5) dan sebagai kontrol diberikan aquades sebanyak 0,1 ml/ hari yang diberikan per-oral dengan cara dimasukkan ke dalam lambung mencit dengan memakai jarum khusus yang ujungnya bulat mirip sonde. Cara seperti ini ditempuh untuk menghindari tumpah atau keluarnya kembali larutan yang diberikan, sehingga bisa dijamin keakuratan jumlah dan dosis dari larutan tersebut. Setelah dipakai larutan tersebut disimpan dalam lemari es.

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dilakukan setiap hari dan hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok yang masing – masing terdiri dari sembilan ekor mencit :

- P0 ( Kontrol ) : Mencit diberikan plasebo (aquadest) per-oral masing masing sebanyak 0,1 ml per-ekor.
- P1 : Mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri L* per- oral dengan dosis 4 mg/0,1 ml per-ekor
- P2 : Mencit diberikan ekstrak *Phyllanthus niruri L* per-oral dengan dosis 8 mg/0,1 ml per-ekor

### 3.3.3. Pengambilan sampel

Pada hari ke 55 semua mencit dikorbankan dengan menggunakan *ether*, kemudian dibuat sayatan pada skrotum. Testis kiri diambil dengan pinset dan gunting *chirurgis* dan dibersihkan dari jaringan sekitar. Testis yang telah

dibersihkan dicuci dengan larutan PBS dan dimasukkan dalam tabung *eppendorf*. Testis dihancurkan dengan cara digerus dengan gelas spatula, setelah itu disentrifus dengan kecepatan 3000 g's selama 10 menit. Supernatan diambil untuk uji *indirect* ELISA.

#### 3.3.4. *Indirect* ELISA

Prosedur *indirect* ELISA untuk pemeriksaan TNF- $\alpha$  menurut Anonimus (2003) dan Burgess (1995) adalah : 1). **Coating Antigen.** Pertama-tama sampel testis yang telah digerus dan disentrifus serta diambil supernatannya diencerkan dalam *carbonate buffer* 1: 250, lalu dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100  $\mu$ l ditutup dengan *aluminium foil*, inkubasi dalam lemari es pada suhu 4°C selama semalam ( kurang lebih 18 jam ), selanjutnya dicuci dengan NaCl-*Tween* 20 sebanyak tiga kali. 2). **Blocking.** Masukkan *buffer blocking* sebanyak 150  $\mu$ l pada setiap sumuran dan ditutup dengan plastik, inkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam dan dicuci dengan NaCl-*Tween* 20 sebanyak tiga kali. 3). **Inkubasi Antibodi.** Antibodi *anti-mouse* TNF- $\alpha$  yang sudah diencerkan dengan *blocking buffer* 1:100 dimasukkan pada tiap sumuran sebanyak 100  $\mu$ l, ditutup dengan plastik dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37 °C lalu dicuci dengan NaCl-*Tween* 20 sebanyak tiga kali. 4). **Inkubasi Konjugat.** Masukkan konjugat *rabbit anti-mouse* yang telah diencerkan dengan *blocking buffer* 1:2500 ke dalam tiap sumuran sebanyak 100  $\mu$ l, tutup dengan *aluminium foil* dan inkubasi selama satu jam pada suhu 37°C kemudian dicuci dengan NaCl-*Tween* 20 sebanyak tiga kali. 5). **Inkubasi substrat.** Tambahkan substrat sebanyak 100  $\mu$ l pada tiap sumuran,

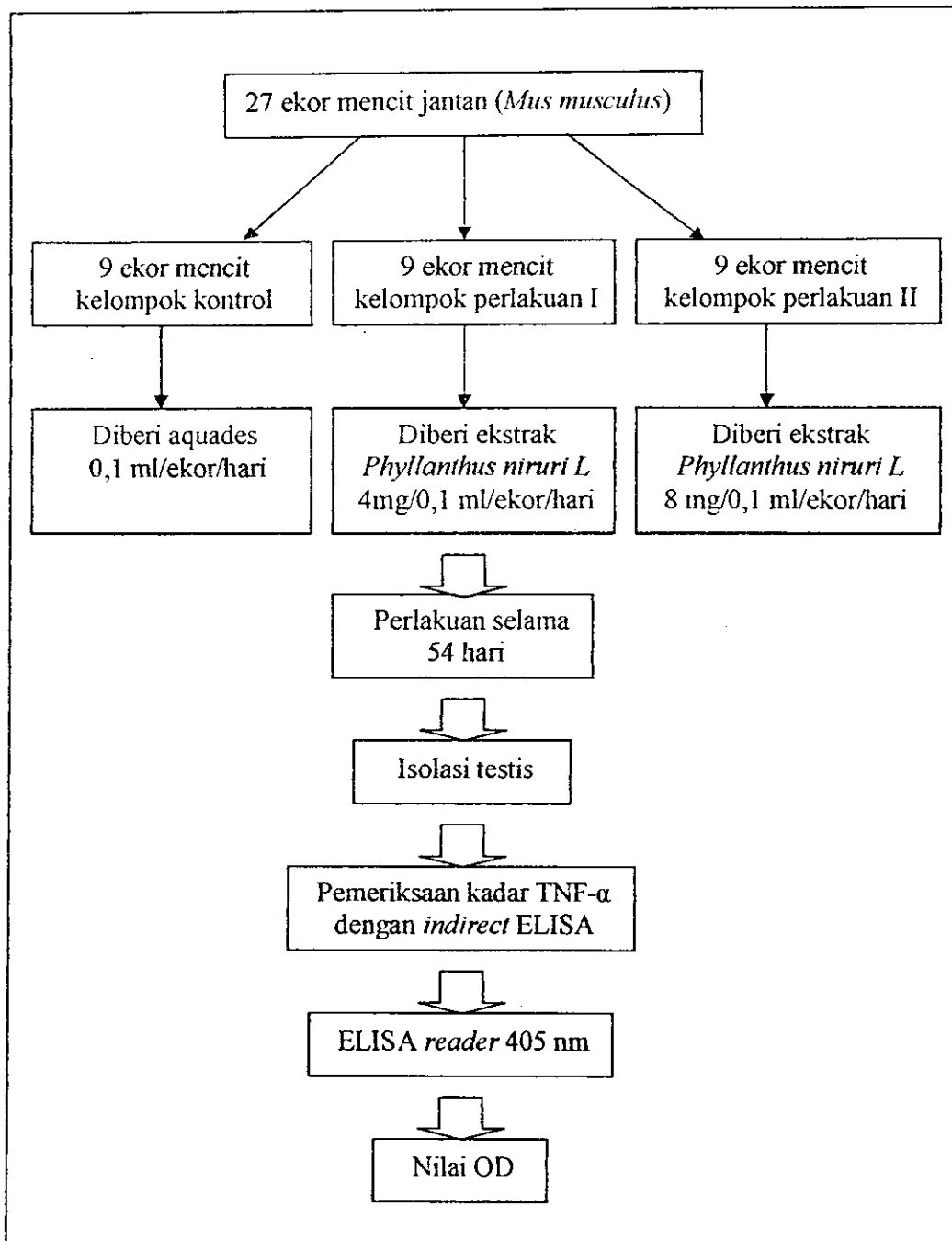


tutup dengan *aluminium foil* kemudian diamkan selama 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap. Tambahkan NaOH 3 N sebanyak 50  $\mu$ l pada tiap lubang untuk menghentikan reaksi. Langkah terakhir dilakukan pembacaan hasil dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm dan akan diperoleh data berupa nilai OD (*Optical Density*) dari kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler.

### 3.3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Kusriningrum, 1989). Data yang diperoleh dari *indirect* ELISA berupa nilai OD dianalisis dengan uji F menggunakan *Statistical Program and Service Solution (SPSS) rel 10,0 for windows* (Santoso, 2000), dan dilanjutkan dengan uji BNJ 5%

### 3.4. Alur Penelitian



**Gambar 2.** Skema Alur Penelitian

# **BAB IV**

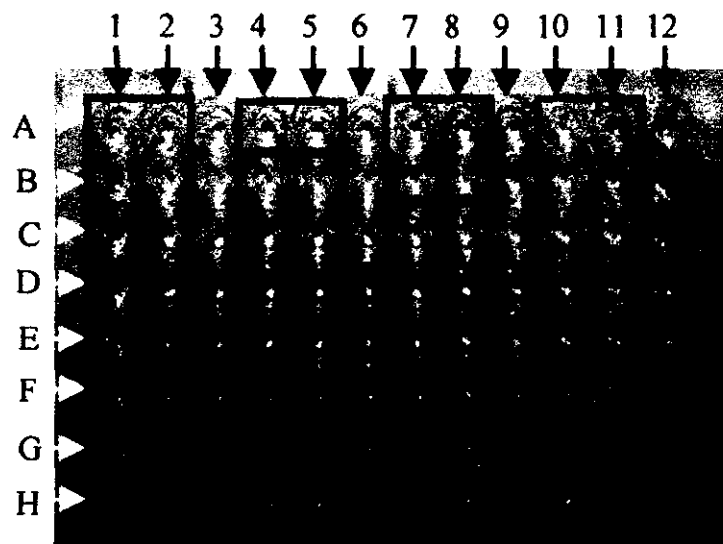
## **HASIL PENELITIAN**

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ Dengan *Indirect* ELISA

Setelah dilakukan isolasi sampel yaitu dengan cara penggerusan dan sentrifugasi pada testis, kemudian hasil isolasi sampel tersebut baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan diperiksa kadar TNF- $\alpha$  nya dengan menggunakan *indirect* ELISA, seperti terlihat pada gambar 3.



**Gambar 3.** *Mikroplate* ELISA yang menunjukkan hasil *indirect* ELISA

Keterangan :

Kotak merah : kelompok P0

Kotak biru : kelompok P1

Kotak hijau : Kelompok P2

Sumuran pada kolom 3,6,9 dan 12 tidak terpakai, karena terjadi reaksi antara antigen dan antibodi yang tidak dikenal.

Hasil *indirect* ELISA seperti terlihat di atas kemudian ditentukan nilai OD-nya dengan menggunakan ELISA *reader* sehingga diperoleh nilai OD dari kadar TNF- $\alpha$  seperti pada tabel 1.

**Tabel 1.** Nilai OD Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$  Intratestikuler Dengan *Indirect* ELISA

P0		P1		P2	
Ulangan	Nilai OD	Ulangan	Nilai OD	Ulangan	Nilai OD
1	0,318	1	0,564	1	0,399
2	0,453	2	0,597	2	0,241
3	0,417	3	0,509	3	0,253
4	0,233	4	0,485	4	0,236
5	0,475	5	0,764	5	0,252
6	0,302	6	0,928	6	0,565
7	0,394	7	0,679	7	0,185
8	0,330	8	0,533	8	0,165
9	0,331	9	0,660	9	0,216

Hasil tersebut di atas kemudian dilakukan analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap, dan hasil analisis tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

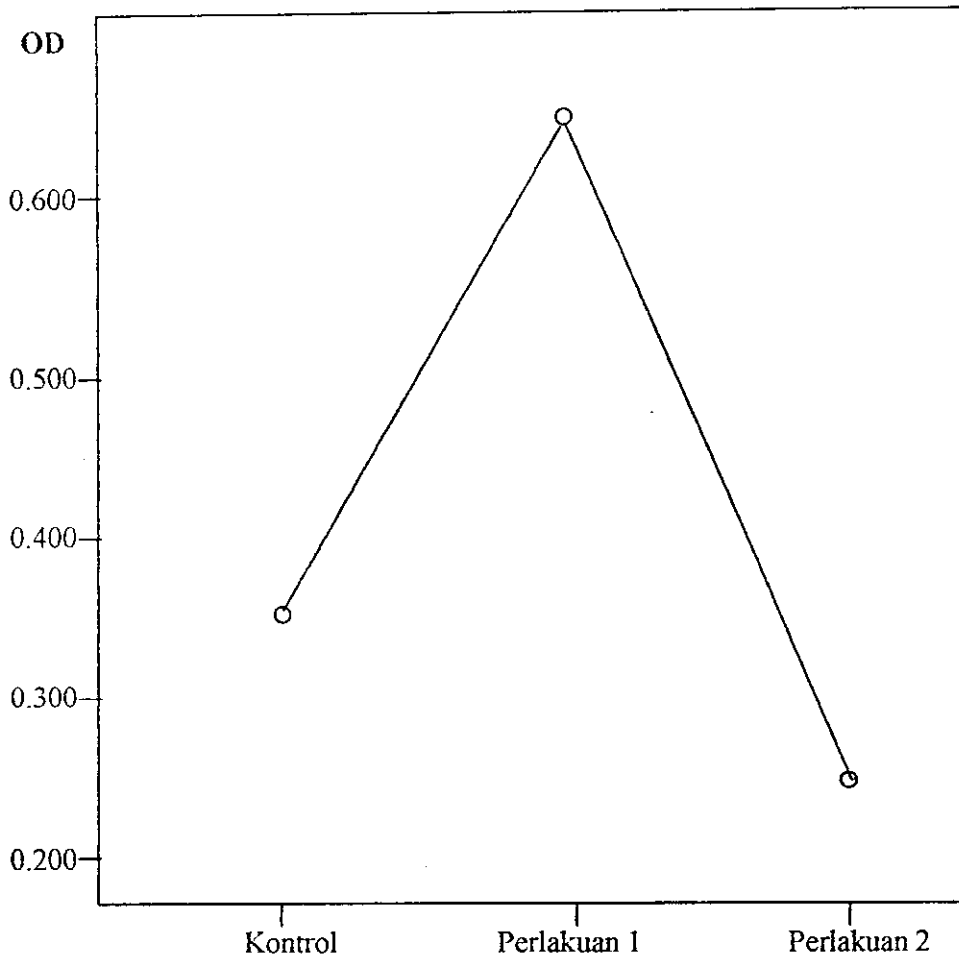
**Tabel 2.** Hasil Analisis Data Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$  Intratestikuler

Perlakuan	Nilai OD rata-rata $\pm$ SD
P0	0,359 <sup>a</sup> $\pm$ 0,079
P1	0,635 <sup>b</sup> $\pm$ 0,142
P2	0,246 <sup>a</sup> $\pm$ 0,066

Keterangan : a,b dengan superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (  $P < 0,05$  )

Pada tabel 2. dapat diketahui perbedaan yang nyata (  $P < 0,05$  ) dari nilai OD rata-rata kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler antara P0 dengan P1, sedangkan antara P0 dengan P2 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (  $P > 0,05$  ).

Dari hasil analisis statistik jika digambarkan dalam bentuk grafik maka akan didapatkan hasil seperti pada gambar 4 (Analisis statistik secara lengkap pada lampiran 3).



**Gambar 4.** Grafik Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$  Intratestikuler

# **BAB V**

## **PEMBAHASAN**

## BAB V

### PEMBAHASAN

#### 5.1. Teknik Isolasi Sampel

Sampel diperoleh melalui teknik penggerusan dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada testis mencit dengan kecepatan 3000 g's selama 10 menit. Teknik ini didasarkan pada penelitian Warren *et al.* (1990) bahwa TNF- $\alpha$  mampu merangsang produksi testosteron pada testis tikus dewasa yang digerus.

Pada penelitian Ulfah (2004) dengan teknik penggerusan dan sentrifugasi pada testis mencit dan dilanjutkan dengan elektroforesis (teknik SDS – PAGE) serta *Western blott* telah mampu mengidentifikasi TNF- $\alpha$  intratestikuler dengan berat molekul 26 KDa, sesuai dengan laporan dari Remick (1997), bahwa TNF- $\alpha$  mempunyai berat molekul sebesar 26 KDa jika terdapat pada membran sel.

#### 5.2. Pengukuran Kadar TNF- $\alpha$ Intratestikuler Dengan *Indirect* ELISA

Sampel yang telah didapatkan dengan teknik penggerusan dan sentrifugasi pada testis mencit kemudian diukur kadar TNF- $\alpha$  nya dengan menggunakan *indirect* ELISA. Alasan dipilihnya uji ini karena hasilnya lebih spesifik dibandingkan dengan metode *direct* ELISA, selain itu bahan yang digunakan telah banyak dipasarkan dan tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi, meskipun disini lain *indirect* ELISA memerlukan biaya sedikit lebih besar (Rantam, 2003).



Hasil dari *indirect* ELISA diperoleh nilai OD seperti tercantum dalam tabel 1, untuk sumuran pada kolom 3,6,9 dan 12 terjadi reaksi silang antara antigen dan antibodi yang tidak dikenal, karena pada penelitian ini tidak menggunakan “*mouse TNF- $\alpha$  standard*” sebagai pembanding terhadap kontrol dan sebagai gantinya dicoba digunakan serum mencit normal ditambah dengan konjugat “*anti -mouse TNF- $\alpha$* ” yang merupakan antibodi poliklonal sehingga menimbulkan reaksi yang tidak spesifik, akan tetapi reaksi tersebut tidak mempengaruhi hasil penelitian, sehingga sumuran pada kolom 3,6,9 dan 12 tidak dipakai. Nilai OD hasil *indirect* ELISA dianalisis statistik (tabel 2) dan hasilnya digambar dalam bentuk grafik seperti pada gambar 4, terlihat bahwa nilai OD kelompok P1 lebih tinggi dan berbeda nyata dengan nilai OD kelompok P0, sedangkan nilai OD kelompok P2 lebih rendah dan tidak berbeda nyata dengan nilai OD kelompok P0. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan dengan pemberian dengan dosis 4 mg/0,1 ml *Phyllanthus niruri L* (dosis terapi) mampu memberikan rangsangan maksimal pada sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler, sedangkan perlakuan dengan dosis 8 mg/0,1 ml *Phyllanthus niruri L* (dosis maksimal) menyebabkan turunnya sekresi TNF- $\alpha$  intra testikuler, bahkan melebihi P0.

Hasil tersebut di atas sesuai dengan penelitian terdahulu, yaitu dengan memberikan ekstrak *phyllanthus niruri L* dengan dosis 2 mg/0,1 ml, 4 mg/0,1 ml dan 8 mg/0,1 ml per-oral selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) mampu meningkatkan spermatogenesis yang diwakili oleh peningkatan ukuran, diameter dan

tebal epitel *tubulus seminiferus* serta jumlah sel spermatosit primer dan sel spermatid. Peningkatan tersebut dimulai pada dosis pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* 4 mg/0,1 ml dan akan semakin menurun pada dosis pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* 8 mg/0,1 ml.

Terjadinya peningkatan kadar TNF- $\alpha$  pada dosis 4 mg/0,1 ml tersebut disebabkan karena ekstrak *Phyllanthus niruri L* merupakan agen imunostimulator yang dapat meningkatkan sekresi TNF- $\alpha$  yaitu melalui stimulasinya terhadap sel limfosit T *helper-1* (sel Th-1) yang akan mensekresi TNF- $\alpha$ , dimana TNF- $\alpha$  yang disekresi oleh sel Th-1 akan mengaktifasi monosit atau makrofag untuk melepaskan *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6) dan TNF- $\alpha$  itu sendiri (Ma'at, 1997), hal ini bukan hanya terjadi secara sistemik tetapi juga terjadi pada organ reproduksi seperti testis, dimana TNF- $\alpha$  yang juga dihasilkan oleh makrofag interstisial testis akan mempengaruhi sel *Leydig*, sel *Sertoli* dan sel germinal pada testis yang akan mempengaruhi proses steroidogenesis dan spermatogenesis (Robertson *et al.*, 1993 ; Morrissette *et al.*, 1999).

Pemberian ekstrak *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 8 mg/0,1 ml menyebabkan turunnya kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler disebabkan karena terjadinya kelelahan / fatik pada sel Th-1 dan makrofag karena rangsangan yang terjadi secara terus menerus, sehingga kadar TNF- $\alpha$  secara bertahap akan turun bahkan melebihi kadar normal (Ma'at, 1997), hal ini disebabkan karena dosis suatu agen imunostimulator tidak mengikuti aturan dosis obat secara normal (Wagner and Jurcic,

1991) sehingga semakin tinggi dosis yang diberikan bukan berarti efek yang diberikan juga semakin besar, terbukti jika tanaman *Phyllanthus niruri L* jika diberikan dengan dosis besar atau berlebihan justru akan bersifat merusak dan bahkan akan menyebabkan impotensi (Wijayakusuma, 2000), untuk itu harus sangat teliti dan hati-hati dalam menentukan dosis pemakaian.

# **BAB VI**

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

Dari uraian diatas bisa ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak

*Phyllanthus niruri L.* mampu mempengaruhi sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler, yaitu :

1. Pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L.*) dengan dosis 4 mg/0,1 ml per-oral pada mencit jantan selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) dapat meningkatkan kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler.
2. Pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L.*) dengan dosis 8 mg/0,1 ml per-oral pada mencit jantan selama 54 hari (satu setengah siklus spermatogenesis) menurunkan kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler.

#### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak *Phyllanthus niruri L.* terhadap sekresi testosteron.

## RINGKASAN

**ANALIS WISNU WARDHANA.** Pengaruh pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L*) terhadap sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler pada mencit jantan (*Mus musculus*) dibawah bimbingan Lilik Maslachah, M.Kes., Drh. sebagai pembimbing pertama dan DR. Hardijanto, MS., Drh. sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L*) per-oral terhadap sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler pada mencit jantan. Penelitian ini dilakukan dengan model penelitian eksperimental laboratorik. Hewan coba yang digunakan adalah 27 ekor mencit jantan berumur rata-rata 2,5 bulan yang dipastikan sudah dewasa kelamin. Pada kontrol diberikan 0,1 ml aquades tanpa ekstrak *Phyllanthus niruri L*, perlakuan yang diberikan pada perlakuan I dan II berupa ekstrak *Phyllanthus niruri L* dengan dosis 4 mg/ 0,1 ml untuk perlakuan I, dan 8 mg/ 0,1 ml untuk perlakuan II. Perlakuan diberikan selama 54 hari dengan pemberian sekali dalam satu hari menggunakan sonde dari spuit 1 ml.

Pada hari ke 55 semua hewan coba dari kontrol, perlakuan I dan perlakuan II dikorbankan, kemudian diambil testisnya diperiksa kadar TNF- $\alpha$  nya secara kuantitatif dengan *indirect* ELISA, lalu hasilnya dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm dan akan didapat nilai dalam bentuk *Optical Density* (OD).

Hasil dari serangkaian analisis yang telah dilakukan menunjukkan bahwa P1 berbeda nyata dengan P0, sedangkan P2 tidak berbeda nyata dengan P0 bila

dilihat berdasarkan nilai *Optical Density* (OD), hal itu disebabkan karena dosis suatu agen imunostimulator tidak mengikuti aturan dosis obat secara normal, sehingga semakin tinggi dosis yang diberikan bukan berarti menghasilkan efek yang tinggi pula, dan terjadinya kelelahan / fatik pada sel imun karena rangsangan yang terjadi secara terus menerus. Sehingga pada penelitian ini bisa ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L*) pada dosis tertentu bisa meningkatkan sekresi TNF- $\alpha$  intratestikuler.

# DAFTAR PUSTAKA



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Paber 1994. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia. WB Saunders Company. 237-294
- Anonimus. 1998. *Phyllanthus (Phyllanthus niruri)*. Virtual Health.com
- Anonimus. 2002. Biochemicals and Reagents for Life Science Research. Sigma. Singapore. 2055-2059.
- Anonimus. 2003. TNF  $\alpha$  (Human, Mouse dan Rat). Titer zyme.com
- Baratawidjaja, K.G. 2000. Imunologi Dasar. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal : 2-30
- Beckerman, K. P. 1997. Reproduction and The Immune System. In Stites, D. P. Terr Abba I. Parslow Tristan G (editor) Medical Immunology 9th edition. Appleton & lange. P: 613-30
- Benahmed, M.1997. Role Of Tumor Necrosis Factor In The Male Gonad. Contracept Fertil sex 25. 569-571
- Burgess, G. W. 1995. Teknologi ELISA Dalam Diagnosis Dan Penelitian. Diterjemahkan oleh Wayan T. Artama. Gajah Mada University Press. Hal : 50-120.
- Dellman J. P. And Brown E. M. 1992. Buku teks Histologi Veteriner. Vol. II. Terjemahan Hartono. Penerbit UI-Press Jakarta. Hal :10-25.
- Dwight, W.W., Vijaya p., Yin Lu, Barbara W.P., Ricard H. 1990. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Stimulant Testosterone Secretion In Adult Male Rat Leydig Cells In Vitro. J. Andrology 11(4). 353-360
- Ferdinandus I. A. 1980. Spermatogenesis ditinjau dari segi Histologi. In : Posiding seminar spermatogenesis. ( Editor oleh KM. Arsyad) Surabaya. Desember. P: 1-16
- Gallin, J.I. 1989. Inflammation In (PulaWE) : Fundamental Immunology 2nd edition. Raver Press. 721-734
- Ganong, W.F. 1993. Review Of Medical Physiology 16 th. Prentice Hall Massachusetts. 234-235

- Hafez, E.S.E. 1993. Spermatozoa And Seminal Plasma. In *Reproducti On In Farm Animal Sixth ed.* Lea and Febiger USA. 165-179
- Hadley, E.M. 1992. *Endocrinology*. Willey Eastren Private Ltd. New Delhi.P:119,190
- Johnson M and Everitt B. 1998. *Essensial Reproductive*. Blackwell scientific Publ. Melbourne. Yahoo.com
- Kusriningrum, R. 1989. *Dasar Rancangan Percobaan dan Rancanagan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 53-70
- Ma'at, S. 1997. *Phyllanthus niruri L* Sebagai Immunostimulator Pada Mencit. Disertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal :13-174
- Maekawa, K., Ji Z.S., Abe, S.I. 1995. proliferation Of New spermatonia By Mamalian FSH Via Sertoli Cell In Vivo. *J. Exp. Zoology* 272. 5
- Mealy, K., Robinson B., Millete C.F., Majzouh J., Wilmore D.W. 1990. The Testicular Effect Of Tumor Necrosis Factor. *J. Pub Med* 211(4). 470-475
- Morrisette, N. Elizabeth, G., Aderem, A. 1999. Meeting Report : The Macrophage a Cell Far All Season. *Trend In Cell Biology* 9. 199-201
- Mursito, Bambang. 2003. *Sehat di Usia Lanjut Dengan Ramuan Tradisional*. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal : 81-82.
- Pentikainen, V., Erikkila K., Suomalainan L., Ojala M., Pentikainen M.O., Parvinen M., Dunhel L. 2001. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(9). 4480-4488
- Rahmahani, J. 2000. Pengaruh Pemberian Ekstrak air *Phyllanthus niruri L* Sebagai Immunostimulator pada Ayam yang Divaksin ND ( Newcastle Disease). Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. Hal:41
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Immunologi*. Edisi Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal : 79-84.
- Remick DG, JS Friedland. 1997. *Tumor Necrosis Factor. Cytokines in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc: 233-233.

- Robertson, D. M., Risbridger, G.P., Hedger, M., Mc Lachla, R.I. 1993. Growth Factors In Central Of Testicular Function In (de kretser): Molecular Biology Of Male Reproductive System. Academic Press Inc. 411-429
- Santoso, S. 2000. SPSS Statistik Parametrik. PT Elex Media Komputindo. Kelompok Gramedia - Jakarta. Hal:12-30
- Staines N. A. Brostoff J and James K. 1993. Introducing Immunology. 2nd edition. Mosby-yearbook Europe Limited, London. P: 27-31.
- Suryohudoyo, P. 2000. Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler. Edisi Pertama. CV. Sagung Seto. Jakarta. Hal: 85-91.
- Sarno, R. 2000. Peran Ekstrak *Phyllanthus niruri L* Terhadap Proses Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus*). Thesis Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal:8-166.
- Sastrowidjojo S. 2001. Obat Asli Indonesia. Dian Rakyat. Jakarta. 182-184
- Thwaites J. C and Hannan G. D, 1989. The Effect Frequency of Ejaculation Under Nutrition on The Size And Tone of The Rats Testis. Animal Reproduction Science. Elseviere science publishers. Amstrerdam. 19 : 29-35.
- Tjokronegoro, A. 1999. Respon Imun Tubuh Terhadap Infeksi Didalam Sistem Reproduksi Pria. Seminar penatalaksanaan infertilitas. 1-20
- Ulfah, N. 2004. Identifikasi TNF- $\alpha$  Dalam Testis Mencit Setelah Pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri L*). Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. Hal:42.
- Wagner H. and Jurcic K, 1991. Assay for Immunomodulation and Effect on Mediators of Inflammation. In (Dey PM< Harborne JB.) Method in Plant Biochemistry, Vol.6: Assay for Bioactivity. Academic Press. London : 195-217.
- Warren D. W., Pasupuleti, Y. Lu, B. W. Platler and R. Horton. 1990. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Stimulate Testosterone Secretion in Adult Male Rat Leydig Cells in vitro: Journal of Andrology. Vol. 11, Issue 4 353-360.
- Widyawaruyanti, A. 1999. Aktivitas Imunomodulator Senyawa-Senyawa Diterpenoid Dari *Andhrographis paniculata NEES* Terhadap Fungsi Sitotoksisitas Limfosit T-Sitotoksik (CD8<sup>+</sup>) Mencit. Thesis Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. Hal:19-22.

Wijayakusuma dan H.M. Hembing. 2003. Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Darah Tinggi. Penebar Swadaya. Jakarta. 64-65

# LAMPIRAN

# LAMPIRAN

**Lampiran 1. Bahan Uji *Indirect* ELISA**1). *PBS-Tween 0,1 %*

<i>Tween 20</i>	1 ml
PBS	ad. 1 liter

2). *Carbonate Buffer*

(*Buffer untuk coating antigen*)

- NaHCO <sub>3</sub>	2,93 gram
- Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 gram
- Aquadest	ad. 1 liter

simpan pada 4<sup>0</sup>C, tidak lebih dari dua minggu.

3). *Blocking Buffer*

(*Buffer untuk blocking dan pengenceran antibodi*)

- <i>Creamer</i>	0,1%
- <i>PBS- Tween</i>	ad. 100 ml

4). *Washing Buffer*

(*Buffer untuk pencuci* ) *NaCl-Tween 20*

- NaCl	9 gram
- <i>Tween 20</i>	1 ml
- Aquadest	ad. 1 liter

buat pH 8,6

5). *Conjugate*

- *Alkaline Phospatase-conjugate rabbit anti-mouse TNF-α*

## Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri L.*)

Pembuatan ekstrak *Phyllanthus niruri L* dilakukan dengan cara maserasi standart. Tumbuhan *Phyllanthus niruri L* yang masih segar (1500 g) diambil semua bagian tanaman (akar, batang, daun, dan bunga) dicuci bersih, tiriskan, dipotong kecil-kecil kemudian diangin-anginkan sampai benar-benar kering (650 g), ditumbuk sampai menjadi serbuk (350 g), dan diayak dengan ayakan no. 60 (200 g). Hasil serbuk dimaserasi dengan pelarut etanol 95% secukupnya sampai rata dan basah, biarkan selama 15 menit. Masukkan bahan tersebut ke dalam perkolator dan dimampatkan. Tambahkan kembali etanol 95% sampai seluruh bahan terendam. Perkolasi dilakukan dengan cara perlahan (1 ml/menit) dan secara bertahap ditambahkan etanol 95% secukupnya sampai perkolat yang ditampung tidak berwarna pekat lagi. Kemudian filtratnya disaring dengan penyaring *buchner*. Total hasil maserasi diuapkan menggunakan *Rotatory Vacum Evaporator* sampai didapatkan larutan pekat, kemudian ditutup dengan *aluminium foil*. Hasil ekstraksi murni dianggap konsentrasi awal 100%, yang setara dengan 50,6 g. Pengeringan dilakukan dengan penguapan penangas air hingga diperoleh ekstrak kering.



**Lampiran 3. Perhitungan Statistik Nilai OD Kadar TNF- $\alpha$  Intratestikuler**

		Nilai OD kadar TNF- $\alpha$ intratestikuler	
Kontrol	1		0.318
	2		0.453
	3		0.417
	4		0.233
	5		0.475
	6		0.302
	7		0.397
	8		0.330
	9		0.311
	Total	N	9
	Rata-rata		0.35356
	Simpangan Baku		0.079881
	Galat Baku		0.026627
Perlakuan 1	1		0.564
	2		0.597
	3		0.509
	4		0.485
	5		0.764
	6		0.928
	7		0.679
	8		0.533
	9		0.660
	Total	N	9
	Rata-rata		0.63544
	Simpangan Baku		0.141560
	Galat Baku		0.047187
Perlakuan 2	1		0.399
	2		0.241
	3		0.253
	4		0.236
	5		0.252
	6		0.265
	7		0.185
	8		0.165
	9		0.216
	Total	N	9
	Rata-rata		0.24578
	Simpangan Baku		0.066296
	Galat Baku		0.022099
Total	N		27
	Rata-rata		0.41359
	Simpangan Baku		0.193075
	Galat Baku		0.037157

**SIDIK RAGAM**

Nilai OD kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler

	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Kuadrat tengah	F	Sig.
Perlakuan	.723	2	.361	35.179	.000
Sisa	.247	24	.010		
Total	.969	26			

**PERBANDINGAN BERGANDA**

Uji Tukey dengan Beda Nyata Jujur

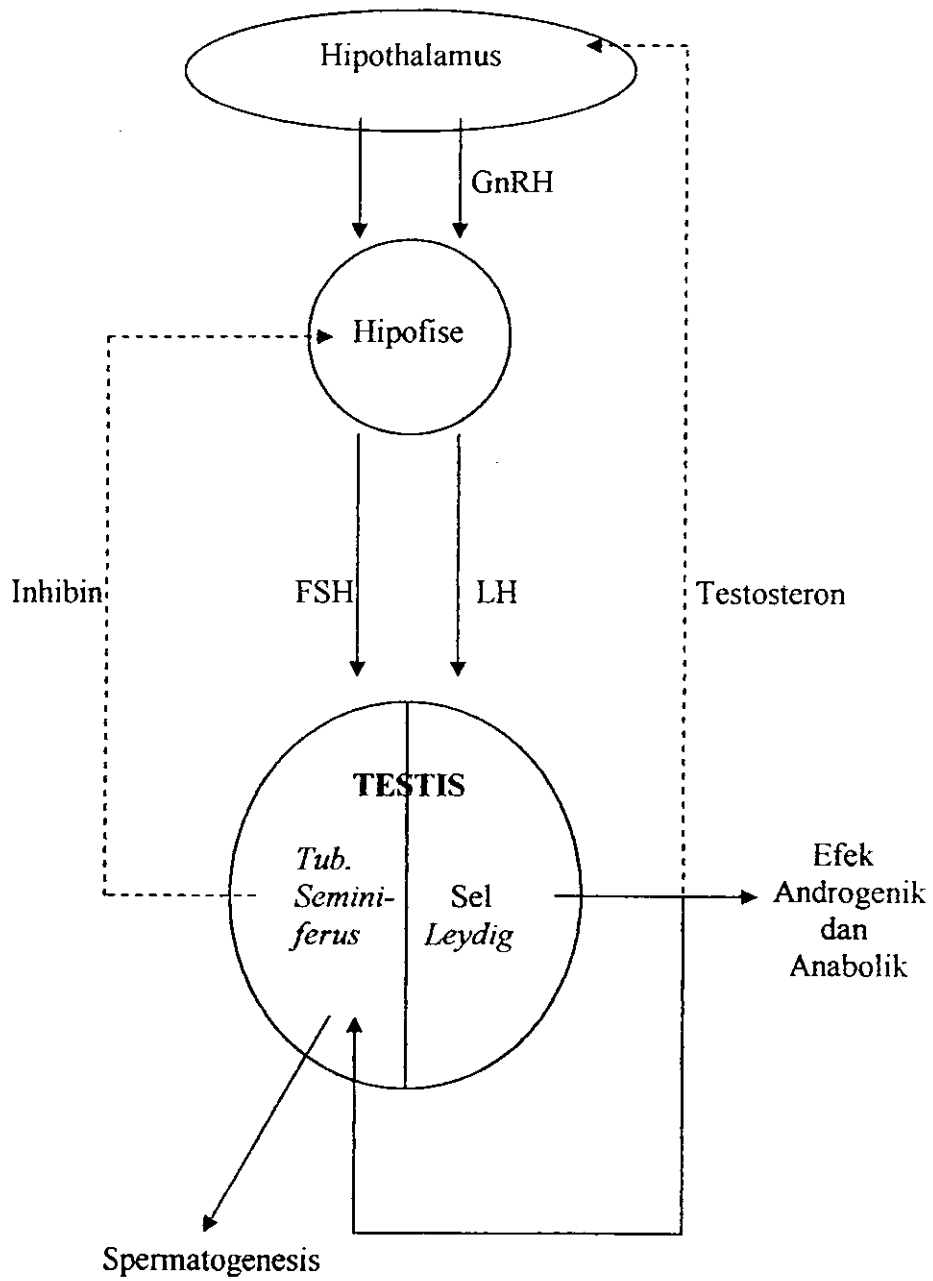
Variabel tidak bebas : Nilai OD kadar TNF- $\alpha$  intratestikuler

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan		Galat Baku	Sig.	Taraf kepercayaan 95%	
					Batas bawah	Batas atas
Kontrol	Perlakuan 1	-.275889	.047777	.000	-.39520	-.15658
	Perlakuan 2	.113778	.047777	.064	-.00553	.23309
Perlakuan 1	Kontrol	.275889	.047777	.000	.15658	.39520
	Perlakuan 2	.389667	.047777	.000	.27035	.50898
Perlakuan 2	Kontrol	-.113778	.047777	.064	-.23309	.00553
	Perlakuan 1	-.389667	.047777	.000	.50898	-.27035

Uji Tukey dengan Beda Nyata Jujur

Perlakuan	N	Untuk alpha=.05	
		1	2
Kontrol	9	.35956	
P1	9		.63544
P2	9	.24578	
Sig.		.064	1.000

Lampiran 4. Skema Alur Poros Hipotalamus-Hipofise-Testis



Keterangan : ——— *feed back positif*  
 - - - - - *feed back negatif*

### **Lampiran 5. Penentuan Dosis Obat**

Dosis ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L*) untuk manusia adalah sebesar 900 – 2700 mg per-hari (Anonimus, 1998) dan angka konversi dari manusia ke mencit dengan berat badan rata – rata 25 gram adalah sebesar 0,0026. Dosis pada manusia kemudian dikalikan dengan angka konversi, sehingga didapat dosis untuk mencit sebesar 2 – 8 mg per-hari. Peneliti mencoba untuk mengamati perubahan sekresi kadar TNF -  $\alpha$  intratestikuler pada mencit jantan setelah pemberian ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri L*) pada dosis terapi 4 mg dan dosis maksimal 8 mg.