

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Gendarussa vulgaris*
Nees TERHADAP HAMBATAN PENETRASI SPERMATOZOA
PADA KUMULUS OOFORUS MENCIT DENGAN METODE
FERTILISASI *IN VITRO* (IVF)**



oleh

ALFI ZUMAROH
BLITAR - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Gendarussa Vulgaris* Nees
TERHADAP HAMBATAN PENETRASI SPERMATOZOA PADA
KUMULUS OOFORUS MENCIT DENGAN METODE
FERTILISASI *IN VITRO***

Skripsi merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

Alfi Zumaroh
069712396

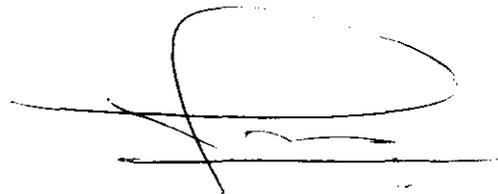
Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Dr. Bambang Poernomo S., M.S., Drh.)

Pembimbing I



(Dr. RTS. Adikara, M.S., Drh.)

Pembimbing II

Setelah mempelajari 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,

Rr. Sri Pantja Madyawati MSi., Drh
Ketua

Rimayanti, Mkes., Drh.
Sekretaris

Hermin Ratnani, Mkes., Drh.
Anggota

Dr. Bambang Poernomo S., M.S., Drh.
Anggota

Dr. RTS. Adikara, M.S., Drh.
Anggota

Surabaya, 28 Juni 2002
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Dr. Ismudiono, M.S., Drh.
NIP. 130 687297

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK AIR DAUN *Gendarussa vulgaris* Nees
TERHADAP HAMBATAN PENETRASI SPERMATOZOA PADA
KUMULUS OOFORUS MENCIT DENGAN METODE
FERTILISASI *IN VITRO* (IVF)**

Alfi Zumaroh

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus dan terhadap kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas serta konsentrasi spermatozoa mencit.

Hewan percobaan yang digunakan terdiri dari 10 ekor mencit jantan galur Balb/c umur empat sampai lima bulan dengan berat badan 20-25 g, yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Penelitian ini dilakukan dengan model percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit jantan dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor mencit. Dua kelompok perlakuan tersebut adalah kelompok Perlakuan I diberi aquadestilata dan kelompok Perlakuan II diberi ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb (1/2 LD₅₀). Pemberian dilakukan setiap hari selama 53 hari (1,5 silus spermatogenesis). Kemudian dilakukan pemanenan spermatozoa dan uji rutin spermatozoa pada masing-masing kelompok perlakuan. Setelah itu dicuci dengan larutan PBS sebanyak tiga kali dan dimasukkan kedalam medium M₁₆ yang berisi sel telur untuk fertilisasi *in vitro*. Setelah lima jam inkubasi, dilihat adanya fertilisasi atau tidak.

Hasil pemeriksaan hambatan penetrasi spermatozoa dianalisis menggunakan Uji - Fisher Exact probability. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa dianalisis menggunakan Uji- Mann Whitney, Sedangkan viabilitas dan konsentrasi spermatozoa dianalisis menggunakan Uji - t. Dari hasil analisis ternyata hambatan penetrasi, motilitas dan viabilitas spermatozoa kelompok Perlakuan I tidak berbeda dibanding kelompok Perlakuan II. Sedangkan konsentrasi spermatozoa kelompok Perlakuan I lebih besar dibanding dengan kelompok Perlakuan II.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT serta sholawat kepada nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Hambatan Penetrasi Spermatozoa Pada kumulus Ooforus Mencit dengan Metode IVF” yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar sarjana di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Dr. Bambang Poernomo S., M.S., Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak Dr. RTS. Adikara, M.S., Drh. sebagai pembimbing kedua yang telah memberi kepercayaan, dukungan, nasihat serta kesediaan waktu dalam membimbing penulis.

Terima kasih pula penulis ucapkan kepada Bapak Bambang Prajogo E.W., Drs. Apt. dan Ibu Widjiati. M.Si., Drh. yang telah memberi kesempatan untuk ikut serta penelitian dalam penyelesaian skripsi ini.

Demikian pula penulis mengucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada Ayahanda dan Ibunda atas do'a, dukungan serta nasihatnya dalam penyelesaian skripsi ini.

Terima kasih juga penulis sampaikan kepada mas Machsun, mas Arif serta teman-teman penelitian Dian, Ida, mbak Rini atas kerjasamanya yang baik.

Terima kasih tidak lupa penulis sampaikan kepada semua rekan mahasiswa dan seluruh pihak yang telah memberikan bantuannya dalam penyusunan skripsi ini.

Akhirnya penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis berharap adanya sumbang saran dari para pembaca guna perbaikan tulisan ini sehingga dapat bermanfaat bagi yang memerlukan.

Surabaya, Pebruari 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang	1
I.2. Perumusan Masalah.....	2
I.3. Landasan Teori.....	3
I.4. Tujuan Penelitian.....	4
I.5. Manfaat Penelitian.....	4
I.6. Hipotesis.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
II.1. Tinjauan Tanaman <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees	6
II.1.1. Klasifikasi Tanaman	6
II.1.2. Nama Daerah	6
II.1.3. Penyebaran dan Tempat Tumbuh	6
II.1.4. Morfologi dan Ekologi.....	7
II.1.4. Kandungan Kimia Tanamn	7
II.1.6. Kegunaan Tanaman	8
II.2. Tinjauan Tentang Hyaluronidase	8
II.3. Tinjauan Tentang Asam Hyalurona	9

II.4. Tinjauan Tentang Mencit.....	9
II.5. Oogenesis.....	10
II.6. Spermatogenesis.....	11
II.7. Fertilisasi.....	12
II.6. Fertilisasi <i>In vitro</i>	14
BAB III. MATERI DAN METODE.....	15
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
III.2. Bahan dan Materi Penelitian.....	15
III.2.1 Bahan Penelitian.....	15
III.2.2. Alat Penelitian.....	15
III.3. Metode Penelitian	16
III.3.1. Pembuatan Sediaan Uji.....	16
III.3.2. Penghitungan Dosis Ekstrak Air	18
III.3.3. Persiapan Hewan Coba	18
III.3.4. Perlakuan Hewan Coba.....	18
III.4. Rancangan Penelitian	21
III.5. Peubah Yang Diamati.....	21
III.6. Analisis Data.....	22
BAB IV. HASIL PENELITIAN	23
IV.1. Fertilisasi <i>In Vitro</i>	23
IV.2. Motilitas Spermatozoa.....	24
IV.3. Viabilitas Spermatozoa	24
IV.4. Konsentrasi Spermatozoa.....	25

BAB V. PEMBAHASAN.....	26
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
VI.1. Kesimpulan	31
VI.2. Saran.....	31
RINGKASAN	32
DAFTAR PUSTAKA.....	34

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil Pengamatan Terhadap Fertilisasi <i>In Vitro</i>	23
2. Hasil Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa	24
3. Hasil Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa (%).....	24
4. Hasil Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa (juta/ml)	25

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Skema Pembuatan Sediaan Uji	14
2. Skema Rancangan Penelitian	37
3. Tanaman <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees	38
4. Sediaan Uji Daun <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees	38
5. Spermatozoa yang Telah Mendapat Perlakuan II Tidak Mengalami Perubahan.....	39
6. Proses Fertilisasi <i>in vitro</i>	39
7. Terbentuknya Zigot Hasil Perlakuan II (Kondisi Normal).....	40
8. Zigot Berkembang Menjadi Dua Sel Hasil Perlakuan II (Kondisi (Normal)	40

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Medium M ₁₆	41
2. Medium Phospat Buffer Saline (PBS)	42
3. Penghitungan Dosis Super Ovulasi	43
4. Pembuatan Drop untuk Medium Kultur.....	44
5. Uji Fertilitas dan Uji Anti Fertilitas Mencit Jantan	45
6. Pengambilan Spermatozoa Mencit	46
7. Uji - Fisher Exact Probability Efek Pemberian EkstrakAir Daun <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees Terhadap Hambatan Penetrasi Spermatozoa pada Kumulus Ooforus Mencit dengan Metode Fertilisasi <i>In Vitro</i>	47
8. Analisis Data Uji - Mann Whitney Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa	48
9. Analisis Data Uji - t Pengamatan terhadap Viabilitas Spermatozoa	49
10. Analisis Data Uji - t Pengamatan terhadap Konsentrasi Spermatozoa .	50

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Indonesia kaya akan sumber bahan alam yang telah digunakan oleh sebagian besar rakyat Indonesia sebagai obat tradisional. Obat tradisional digunakan sejak nenek moyang secara turun temurun (Anonim, 1983). Apalagi akhir-akhir ini sistem pengobatan menggunakan obat tradisional kembali menjadi topik yang hangat. Hal ini karena banyak masyarakat yang memilih menggunakan obat tradisional daripada obat modern (Anonim, 1999). Sedangkan alasan masyarakat lebih memilih menggunakan obat tradisional adalah tanaman tersebut mudah diperoleh, dapat ditanam di pekarangan sendiri, murah serta dapat diramu sendiri di rumah (Anonim, 1983).

Laki-laki merupakan 50 % dari peserta program KB yang partisipasinya kurang. Kekurangan partisipasi laki-laki mungkin disebabkan keterbatasan sarana. Tiga metode yang dianggap dapat digunakan oleh laki - laki adalah : kondom, vasektomi dan senggama terputus atau koitus interruptus (Adimulya, 1987).

Gendarussa vulgaris Nees merupakan salah satu tanaman dari famili acanthaceae yang digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional (Heyne, 1987). Di Irian jaya daun dan akarnya direbus digunakan untuk kontrasepsi laki-laki (Moeso dan Agus, 1985).

Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees mengandung senyawa flavonoid, iridoid, alkaloid, triterpan, steroid

dan minyak menguap. Ternyata yang mempunyai efek antifertilitas adalah senyawa flavonoid dan alkaloid (Didiet, 1988). Sedangkan menurut Fransworth and Waller (1982), flavonoid mempunyai aktivitas inhibitor enzim hyaluronidase. Enzim hyaluronidase berfungsi membuka matrik kumulus ooforus dengan jalan melarutkan asam hyalurona (Prajoko dkk, 1997^a). Apabila enzim ini dihambat, maka spermatozoa tidak dapat melaksanakan fungsinya untuk membuka matriks kumulus ooforus, sehingga tidak terjadi fertilisasi (Li *et al.*, 1997).

Bertolak dari keterangan di atas, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui bahwa daun *Gendarussa vulgaris* Nees mempengaruhi hambatan penetrasi spermatozoa dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba.

I.2. Perumusan Masalah

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

1. Apakah ada pengaruh pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2 LD_{50}$ terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit (*Mus musculus*)?
2. Apakah ada pengaruh pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2 LD_{50}$ terhadap penurunan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa?

I.3. Landasan Teori

Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menurunkan kadar testosteron dalam serum darah tikus. Hormon testosteron berfungsi pada aktivitas mitosis dan meiosis. Sehingga jika kadar hormon testosteron berkurang dapat mengakibatkan penurunan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa. Pada daun diketahui komponen dominan adalah flavonoid (Prajogo dkk., 1994).

Penelitian fraksi diklormatan dan metanol daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menghambat spermatogenesis. Hambatan spermatogenesis tersebut meliputi penurunan jumlah sel-sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa (Prajogo dkk., 1997^b).

Pada penelitian fraksi N- Butanol daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menghambat fertilisasi (Padmawati, 2000). Sedangkan penggunaan daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan cara merebus akar dan daunnya, maka perlu dilakukan penelitian tentang efek pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui pengaruh *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit (*Mus musculus*).
2. Mengetahui pengaruh *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa.

1.5. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit.
2. Dengan diketahui hasil penelitian ini, diharapkan dapat dijadikan acuan untuk menemukan metode kontrasepsi laki-laki yang lebih tepat.
3. Membantu melengkapi metode eksplorasi tanaman obat Indonesia yang pemberiannya berkaitan dengan antifertilitas.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan permasalahan di atas maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2 LD_{50}$ dapat menghambat penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit (*Mus musculus*).
2. Pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2 LD_{50}$ dapat menurunkan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Tinjauan Tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees

II.1.1. Klasifikasi Tanaman

Secara taksonomi tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees tergolong dalam kingdom : Plantae, phylum : Spermatophyta, sub phylum : Angiospermae, kelas : Dicotyledanae, Sub kelas : Sympetale, Ordo : Scophulariales, Famili : Acanthaceae, Genus : *Justicia*, Spesies : *Gendarussa vulgaris* Nees, Sinonim: *Justicia gendarussa* Burm F, *Justicia dahona* (Buch) Ham, *Justicia vulgaris* Lour, *Justicia salicina* Vahl (Backer and Van Den Brink, 1965).

II.1.2. Nama Daerah

Di Indonesia tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees telah lama di kenal, pada masing-masing daerah telah mempunyai sebutan sendiri. Nama daerah *Gendarussa vulgaris* Nees yang sudah diketahui adalah : besi-besi di Sumatra (Aceh), gandarusa di Melayu, handarusa di Sunda, gandarusa atau tetesan atau trus di Jawa, ghandarusa di Madura, puli di Maluku (Heyne, 1987; Siti, 1995).

II.1.3. Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tempat tumbuh asal tanaman ini tidak diketahui, daerah penyebaran terutama di daerah tropis termasuk Indonesia. Di Jawa terdapat di daerah rendah sampai ketinggian 500 m dari permukaan laut. Pada umumnya tanaman ini

sebagai pagar hidup dan juga tumbuh liar secara lokal di batas tanaman hutan dan di tanggul sungai (Siti, 1995; Anonimus, 1999).

II.1.4. Morfologi dan Ekologi

Gendarussa vulgaris Nees merupakan tanaman setengah perdu tegak, sering bercabang banyak, 0,7 – 0,8 meter tingginya. Batang segiempat tumpul atau cukup bulat, yang muda ungu, yang tua coklat muda. Tangkai daun 5 – 8 mm, helaian daun bentuk lanset, beringgit lebar dan tidak dalam, seperti kulit tipis, 6 – 20 kali 1,5 – 3,5 cm. Bunga terkumpul dalam malai sangat sempit, 3 – 12 cm panjangnya, yang tersusun rata. Daun pelindung kecil, sempit, runcing dan boleh dikatakan sama. mahkota gundul, tabung pucat, berbintik ungu. Pinggiran mahkota berbibir dua; bibir bawah bentuk baji hingga bulat telur terbalik, dengan tiga taju membulat pendek, putih, pada pangkal ungu, berbintik dan dengan lipatan miring; bibir atas segitiga, runcing, putih, berbintik ungu. Tangkai putik gundul, 6 – 10 mm. Buah bentuk gada, gundul, berbiji empat.. *Gendarussa vulgaris* Nees banyak terdapat di kuburan, pagar, hutan, dan tepi-tepi sungai (Van Steen *et al.*, 1987; Anonim, 1999).

II.1.5. Kandungan Kimia Tanaman.

Tanaman ini mengandung senyawa-senyawa : alkaloida yang sedikit beracun, flavonoid, iridoid, triterpen, sterol, minyak menguap dan mempunyai kadar kalium yang tinggi (Prajogo dkk., 1997^a).

II.1.6. Kegunaan Tanaman

Daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat digunakan sebagai obat encok, obat sakit kepala, obat sakit pinggul, bisul, juga untuk keseleo dan rematik. Akar dan daun *Gendarussa vulgaris* Nees digunakan dalam beberapa ramuan obat tradisional, antara lain untuk kontrasepsi laki-laki (Moeso dan Agus, 1985).

Di Melayu, daun ditumbuk bersama merica putih digunakan sebagai obat dalam untuk mengatur datang bulan yang tetap. Sedangkan di Sulawesi selatan daun ini digunakan sebagai obat pencuci perut. Akar *Gendarussa vulgaris* Nees hitam digiling dengan air dapat digunakan sebagai obat terhadap cupak atau upas putih (Heyne, 1987).

II.2. Tinjauan tentang Hyaluronidase

Hyaluronidase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas pada asam hyalurona dan tidak aktif pada substrat lain. Hyaluronidase pertama kali diisolasi dari mikroorganisme, kemudian pada testis mamalia yang saat ini merupakan sumber utama. Enzim yang berasal dari bakteri mempunyai aktivitas eliminase, sementara hyaluronidase dari testis, mempunyai aktivitas transglukolase (Linker, 1971). Hyaluronidase berada pada bagian kepala spermatozoa mamalia yang berperan membuka matriks kumulus ooforus saat penetrasi pada lapisan sel granulosa sel telur (Meyer dkk., 1960).

II.3. Tinjauan tentang Asam Hyaluroana

Asam hyalurona adalah suatu mukopolisakarida asam terdiri dari unit ulangan n – asetil glukosamin dan asam glukoronat yang berikatan (1 – 4) dan asam glukoronat melekat pada n – asetil glukosamin berikutnya melalui ikatan (1-3). Asam hyalurona terdapat dalam bakteri dan terdispersi dalam berbagai mikroorganisme serta jaringan, termasuk dalam cairan sinovial, lensa mata dan sebagai perekat dalam jaringan penghubung. Dalam kumulus ooforus dan korona radiata pada lapisan ovum. Asam hyalurona berfungsi sebagai perekat sel penyusun matriks, selanjutnya kumulus tertanam dalam matriks tersebut (Gilbert dkk,1988).

II.4. Tinjauan tentang Mencit

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam biomedik moderen. Alasan penggunaan karena banyak varietasnya, ukuran yang sesuai, subur, waktu penyiapan pendek, dan mudah pemeliharaannya (Morse,1981).

Mencit peka atau tahan terhadap penyakit – penyakit yang dialami manusia karena itu binatang ini sering digunakan di bidang genetika, imunologi, biologi seluler dan onkologi (Morse,1981). Lama hidup mencit satu sampai dua tahun, ada yang mencapai tiga tahun. Umur dewasa 35 hari, umur pertama kali kawin delapan minggu, berat dewasa 20-40 g (jantan) dan 18- 35 g (betina) (Smith dkk., 1988).

Pada tikus dan mencit puberitas dimulai bersamaan dengan penurunan testis ke dalam skrotum. Pada mencit proses mitosis memerlukan waktu kira-kira delapan hari, meiosis lengkap diperkirakan 13 hari dan spermiogenesis kira-kira 13,5 hari. Jadi proses spermatogenesis pada mencit membutuhkan waktu sekitar 35 hari (Whitingham and Wood, 1992).

II.5. Oogenesis

Oogenesis adalah proses pembentukan ovum dari oogonium di dalam ovarium. Sel primordial (asal) dalam ovarium yang bersifat diploid adalah oogonium, dalam pertumbuhannya membentuk oosit primer bersifat diploid. Oosit primer mengalami meiosis I sehingga terbentuk dua sel anakan, yang satu sel besar disebut oosit sekunder dan yang satu sel kecil disebut badan kutub I, yang keduanya bersifat haploid karena telah terjadi pembagian atau penyusutan pada kromosom. Kedua sel ini mengalami meiosis II, pada sel oosit sekunder juga dihasilkan dua sel anakan, yang satu besar disebut ootid sedangkan yang satu kecil disebut badan kutub II. Badan kutub hasil meiosis I juga berlangsung meiosis II, hasil anakan berupa badan kutub. Namun sel badan kutub mengalami degenerasi dalam perkembangannya hingga akhirnya mati, sedang ootid mengalami perkembangan menjadi ovum. Dengan demikian pada oogenesis, satu sel induk akhirnya membentuk satu ovum yang fungsional dan tiga sel badan kutub yang tidak fungsional (tidak terlibat dalam pembuahan) (Hafez, 1993).

II.6. Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah proses pembentukan spermatozoa dari spermatogonium, melalui perkembangan yang kompleks dan teratur di dalam tubulus seminiferus. Spermatogenesis terdiri dari dua fase utama. Fase pertama adalah spermatogenesis dan fase ke dua adalah spermiogenesis .

Selama proses spermatogenesis sel-sel germinatif akan mengalami perubahan-perubahan sebelum siap untuk mengadakan fertilisasi. Sel germinatif yang pertama adalah spermatogonia atau disebut juga sel primitif. Sel ini akan mengalami pembelahan mitosis beberapa kali sebelum menjadi spermatosit . Ada dua tipe spermatogonia di dalam testis yaitu tipe A yang selalu mengalami pembelahan mitosis beberapa kali dan menghasilkan spermatogonia yang lain . Sedangkan tipe B mengalami pembelahan mitosis dan menghasilkan dua sel spermatosit primer .

Sel germinatif yang ke dua adalah spermatosit. Sel ini dibagi menjadi dua yaitu spermatosit primer dan spermatosit sekunder. Sel spermatosit primer mengalami pembelahan menjadi spermatosit sekunder. Sel spermatosit sekunder dengan cepat mengalami pembelahan meiosis menjadi spermatid. Kromosom spermatid menjadi haploid. Fase terjadinya proses pembelahan spermatogonia menjadi spermatid disebut spermatositogenesis.

Sel germinatif yang ke tiga adalah spermatid, sel ini merupakan sel yang lebih kecil dari sebelumnya. Spermatid ini tidak mengalami pembelahan tetapi mengalami metamorfosis dan perubahan bentuk. Perubahan ini adalah : a) aparat golgi menjadi kromosom atau tudung anterior, inti spermatid menjadi kepala

sperma, dari sentriol keluar ekor (flagella), plasma membran menjadi selubung tubuh sperma dan mitokondria mengumpul di bagian ekor. Peristiwa spermatid mengalami metamorfosis dan perubahan bentuk sehingga menjadi spermatozoa tersebut dikenal sebagai spermiogenesis (Poernomo dkk., 1995). Lama siklus spermatogenesis diukur mulai dari perubahan spermatogonium menjadi spermatozoa. Siklus spermatogenesis berlangsung konstan pada mencit selama 34,5 hari (Whittingham and Wood, 1992).

II.7. Fertilisasi

Fertilisasi adalah proses bersatunya sel telur dan spermatozoa sehingga membentuk sebuah sel baru yang disebut zigot. Saat terjadi ovulasi, sel telur yang dilepaskan oleh ovarium tertangkap oleh finbre, selanjutnya akan masuk ke tuba falopii untuk bertemu dengan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi. Tempat pertemuan sel telur dengan spermatozoa terjadi di dalam ampula dari tuba falopii. Saat bertemu dengan spermatozoa sel telur masih terbungkus oleh sel-sel granulosa yang berasal dari folikel dan zona pelusida yang langsung menyelubungi sel telur. Untuk dapat mencapai inti, sel telur harus menembus lapisan sel granulosa, zona pelusida dan membrana vitelin (Hafez, 1993).

Spermatozoa setelah memasuki ampula menjadi semakin aktif, hal ini disebabkan adanya zat-zat yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa menjadi aktif yang diproduksi oleh mukosa ampula. Zat-zat tersebut diantaranya adalah bikarbonat, asam amino, oksigen dan steroid (Partodihardjo, 1992).

Sel-sel granulosa satu sama lain akan diikat oleh asam hyalurona. Spermatozoa yang telah mengalami kapasitas di bagian kepalanya mengandung hyaluronidase yang berfungsi melisiskan asam hyalurona. Selanjutnya spermatozoa menembus zona pelusida kemudian bersentuhan dengan membrana vitelin dan akan mengakibatkan reaksi zona yaitu suatu reaksi dari zona pelusida agar tidak dapat ditembus oleh spermatozoa lain. Reaksi zona ini berjalan bertahap yang dimulai dari sekitar lobang tembus zona pelusida yang dibuat oleh spermatozoa, kemudian meluas ke seluruh permukaan zona pelusida. Setelah spermatozoa menembus zona pelusida spermatozoa masuk ke dalam selaput vitelin. Ekor spermatozoa masuk ke dalam membrana vitelin, kemudian terlepas.

Saat kepala spermatozoa menembus membran plasma, maka granula korteks yang terletak di bawah membrana vitelin akan lepas dan membentuk ruang perivitelin. Bersamaan dengan itu akan dilepaskan badan kutub II. Kepala spermatozoa membesar membentuk pronukleus jantan. Sedangkan ovum mengalami aktivasi dan membentuk pronukleus betina. Terjadilah fusi pronukleus, membrana pronuklei pecah dan menghilang, kromosom spermatozoa dan kromosom ovum bersatu sehingga terbentuk zigot yang bersifat diploid (Hafez, 1993).

II.8. Fertilisasi *InVitro*

Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan spermatozoa dan sel telur di luar tubuh (Poernomo dkk., 1995). Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu proses fertilisasi yang rumit. Kerumitan teknik IVF terletak pada pengendalian kondisi kedua obyek utama yaitu sperma dan oosit. Masing-masing kedua obyek ini memerlukan penanganan khusus. Sperma perlu mendapatkan perlakuan seperti layaknya kapasitas pada proses fertilisasi *in vivo* yaitu untuk memperbanyak DNA dalam inti dan meningkatkan permeabilitas akrosom. Fungsi kapasitas sperma yang lain adalah memberi kemampuan sel sperma mengadakan fusi antar membran sel dengan akrosom. Sedangkan pematangan oosit diupayakan hingga benar-benar sama dengan oosit yang diovulasikan yaitu pada stadium metafase II, dengan adanya badan kutub I dan pronukleus betina.

Pada maturasi oosit maupun pencucian dan kapasitas sperma memerlukan media yang disimpan dalam inkubator pada suhu sekitar 38⁰ C dengan kandungan CO₂ 5%, udara 95% dan dengan kelembaban 90-100% sehari sebelum dipakai. Sebagai penutup media digunakan minyak mineral. Minyak mineral ini berfungsi untuk meniadakan penguapan, mengatur pertukaran gas secara teratur dan menghindari kontaminasi media oleh kuman selama inkubasi (Hafez, 1993).

Keberhasilan maturasi oosit, selain tergantung pada media dan zat aditifnya, juga tergantung kualitas inkubator CO₂ yang dipakai. Inkubator CO₂ yang baik adalah inkubator yang dapat mendistribusikan dan mengatur konsentrasi CO₂ secara tetap merata dan dengan suhu sekitar 38⁰ C.

BAB III
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB III

MATERI DAN METODE

III.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian meliputi persiapan dan perlakuan hewan percobaan, koleksi sel telur, koleksi sel sperma dan fertilisasi *in vitro*. Penelitian ini dilakukan mulai Pebruari 2001 sampai Juni 2001.

III.2. Bahan dan Materi Peneliti

III.2.1. Bahan Penelitian

Semua bagian daun *Gendarussa vulgaris* Nees (daun pucuk, daun muda dan daun tua), mencit jantan umur 4-5 bulan dan betina umur 2-4 bulan galur Balb C dengan berat badan 20-25 g, medium M16, Medium Phospat Buffer Saline (PBS), Human Chorionic Gonadotropin (hCG), Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG), minyak mineral serta Bovine Serum Albumin (BSA).

III.2.2. Alat Penelitian

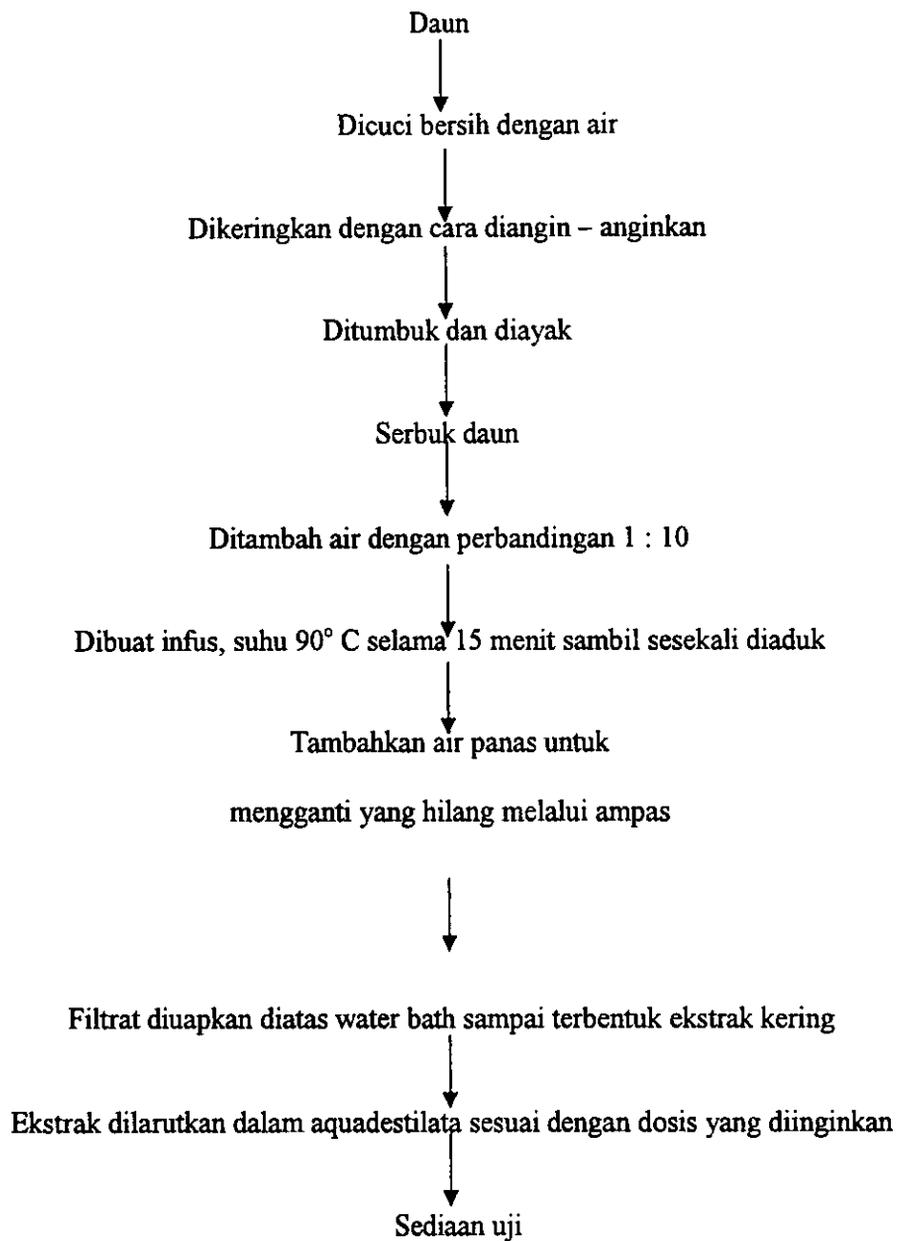
Mikroskop inverted, timbangan analitik, sonde, gunting bedah, syringe disposable (1cc, 5cc, 10cc), pipet Pasteur, petridisk disposable, nuclon, gunting mikro, pinset mikro, mikro pipet, penyaring buchner, cawan porselen, dan waterbath.

III.3. Metode Penelitian.

III.3.1. Pembuatan sediaan uji

Sediaan uji adalah ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees yang diperoleh dari :

1. Serbuk daun ditimbang 50g, dimasukkan dalam panci infus kemudian ditambahkan air 500 ml
2. Dipanaskan dalam panci infus dengan suhu 90⁰C selama 15 menit dihitung mulai air pada panci mendidih.
3. Disaring selagi panas menggunakan penyaring Buchner. Bila filtrat yang diperoleh kurang dari 500 ml, ditambahkan air panas melalui ampas sampai diperoleh volume yang diinginkan.
4. Filtrat yang diperoleh diuapkan di atas water bath sampai kering.
5. Ekstrak kering ditimbang sesuai dosis yang diinginkan kemudian dilarutkan dalam aquadestilata.



Gambar 1. Skema pembuatan sediaan uji

III.3.2. Penghitungan Dosis Ekstrak Air

Telah diketahui LD_{50} Ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees adalah 31,37773 g/kg bb mencit (Marlina, 2001). Dosis yang dipakai pada penelitian ini adalah $1/2 LD_{50}$.

$$\text{Perlakuan} = 1/2 LD_{50} = 1/2 \times 31,37773 \text{ g/kg bb} = 15,69 \text{ g/kg bb}$$

Penggunaan dosis pada mencit adalah :

Misal mencit berat badan 20 g dan mendapat perlakuan ($1/2 LD_{50}$) maka dosis yang diperlukan adalah $20\text{g}/1000 \text{ g} \times 15,69 \text{ g} = 313,8 \text{ mg}$.

Pemberian dosis 313,8 mg/kg bb ditambah 0,5 ml aquadestilata.

III.3.3. Persiapan Hewan Coba

Mencit jantan berjumlah 10 ekor yang telah diuji fertilitasnya dipelihara dengan diet dan cara yang sama selama satu minggu agar dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Uji fertilitas mencit jantan dengan cara dikawinkan dengan betina yang sebelumnya dilakukan superovulasi. Mencit jantan fertil adalah yang dapat memberikan kebuntingan pada mencit betina.

III.3.4. Perlakuan Hewan Percobaan

Sepuluh ekor mencit jantan yang telah dilakukan uji fertilitas dibagi dalam dua kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor untuk uji anti fertilitas yaitu :

- a. Kelompok Perlakuan I : lima ekor (diberi aquadest)
- b. Kelompok perlakuan II : lima ekor (ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees 15,69 g/kg bb)

Dosis diberikan dalam mg/20g bb mencit (untuk memudahkan perhitungan dan pemberian dosis perlakuan). Berat badan mencit adalah berat badan yang diperoleh dari penimbangan seminggu sekali. Pemberian larutan perlakuan *per-oral* selama 53 hari (1,5 siklus spermatogenesis). Sperma diambil dari bagian kauda epididimis setelah mencit dikorbankan dengan cara dislokasio leher. Kauda epididimis yang diambil dicuci dalam medium PBS sebanyak tiga kali kemudian dipindahkan ke dalam medium M16 sambil dihancurkan dengan menggunakan gunting mikro.

Pemeriksaan Rutin Sel Spermatozoa

Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak air terhadap motilitas dan viabilitas dan spermatozoa mencit.

Pemeriksaan ini meliputi :

1. Pemeriksaan motilitas spermatozoa

Satu tetes sperma ditetaskan diatas obyek glass dan ditutup dengan cover glass. Selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang motil adalah yang bergerak ke depan lurus dengan kecepatan sedang.

2. Viabilitas spermatozoa

Satu tetes sperma ditetaskan diatas obyek glass, dicampur dengan 1 tetes larutan Eosin Bluish 1 % (dalam aquadest). Diaduk rata, dibuat sediaan

hapusan dan dikeringkan di udara kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang hidup akan terlihat tidak berwarna diatas dasar warna merah, sedangkan spermatozoa yang mati akan terlihat berwarna merah. Hasilnya dibuat persentase spermatozoa yang hidup

3. Konsentrasi spermatozoa

Spermatozoa dihisap dengan pipet hemositometer sampai tanda 0,5 kemudian ditambah larutan eosin sampai tanda 101. Kemudian tekuk ujung karet penghisap dan kocok pipet dengan gerakan membentuk angka delapan beberapa kali sampai larutan di dalamnya homogen. Larutan didalam pipet dibuang 3 – 4 tetes, selanjutnya larutan diteteskan di atas papan hitung melalui salah satu sisi gelas penutup. Penghitungan sel spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop.

Koleksi Sel Telur dan Fertilisasi *In Vitro*

Pertama kali melakukan super ovulasi dengan menggunakan PMSG dan hCG yaitu : mencit betina disuntik secara intra peritoneal dengan PMSG 5 IU, 48 jam kemudian disuntik dengan hCG 5 IU. Kemudian mencit langsung dikawinkan dengan pejantan kastrasi, 17 jam kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina dan langsung dilakukan pembedahan terhadap betina yang positif kawin. Sel telur dikoleksi dari tuba fallopii bagian ampula, yaitu dalam kantong fertilisasi. Sel telur yang telah dipanen dicuci berturut – turut dengan medium PBS sebanyak tiga kali dan medium M16 sebanyak tiga kali kemudian dipindahkan ke dalam medium fertilisasi. Sedangkan sperma dari mencit diambil dengan menggunakan pipet yang telah dimodifikasi dari kauda epididimis,

kemudian dibenamkan ke dalam medium M16 yang telah berisi sel telur. Setelah itu diinkubasi dengan inkubator CO₂ selama tiga jam dan diamati terjadi fertilisasi atau tidak.

III.3.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hasil perbedaan antar perlakuan hanya disebabkan oleh pengaruh perlakuan dan pengaruh acak saja. Penelitian ini menggunakan pengacakan yang paling sederhana yaitu menggunakan cara lotre (Kusriningrum, 1989). Skema rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 2 (hal. 37).

III.3.6. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah adanya hambatan penetrasi spermatozoa (tidak terjadi fertilisasi) atau tidak terjadi hambatan penetrasi spermatozoa (terjadi fertilisasi). Apabila terjadi fertilisasi maka sel granulosa sudah tidak utuh, terbentuk pronukleus jantan dan betina, terdapat kepala dan ekor sperma pada inti sel telur serta telah terbentuk zigot. Jika tidak terjadi fertilisasi maka sel granulosa tetap utuh, tidak terbentuk pronukleus jantan dan betina, tidak ada kepala dan ekor spermatozoa pada inti sel telur serta tidak terbentuk zigot. Selain itu sebagai data pendukung diamati pula motilitas, viabilitas dan konsentrasi sel spermatozoa.

III.3.7. Analisis Data

Data dikumpulkan berdasarkan adanya hambatan penetrasi spermatozoa (tidak terjadi fertilisasi) dan tidak adanya hambatan penetrasi spermatozoa (terjadi fertilisasi). Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji-Fisher exact probability. Data pendukung berupa motilitas spermatozoa dianalisis dengan uji - Mann Whitney, sedangkan viabilitas dan konsentrasi spermatozoa dianalisis dengan menggunakan uji - t (Warren and Bown, 1986; Sugiyono, 2001).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian tentang efek pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 15,69 g/kg bb (Perlakuan II) dan aquadest (Perlakuan I) tiap hari selama 53 hari.

IV. 1. Fertilisasi *In Vitro*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 15,69 g/kg bb ($1/2 LD_{50}$) tidak menyebabkan hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit (terjadi fertilisasi).

Tabel 1. Fertilisasi *In Vitro*

Kelompok	Terjadi Fertilisasi	Tidak Terjadi Fertilisasi
Perlakuan I	5	-
Perlakuan II	5	-

Setelah dianalisis dengan menggunakan uji - Fisher Exact Probability, ternyata tidak ada perbedaan antara kelompok Perlakuan I dengan kelompok Perlakuan II ($P < 0,05$). Lihat Gambar 6 (hal. 40).

IV. 2. Motilitas Spermatozoa

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb tidak menurunkan motilitas spermatozoa.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Ulangan	Perlakuan I	Perlakuan II
1	+++	+++
2	+++	+++
3	+++	+++
4	+++	+++
5	+++	+++

Setelah dianalisis dengan menggunakan Uji - Mann Whitney ternyata motilitas spermatozoa antara kelompok Perlakuan I tidak berbeda dengan kelompok Perlakuan II ($P > 0,05$). Lihat Gambar 5 (hal. 39).

IV. 3. Viabilitas Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb tidak menurunkan viabilitas spermatozoa.

Tabel 3. Hasil Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa (%)

Ulangan	Perlakuan I	Perlakuan II
1	61,53	55,55
2	70,00	54,54
3	63,64	63,63
4	55,56	60
5	66,67	60

Setelah dianalisis dengan menggunakan uji - t, ternyata kelompok Perlakuan I menunjukkan persentase viabilitas yang tidak berbeda dengan kelompok Perlakuan II ($P>0,05$). Lihat Gambar 5 (hal. 39).

IV.4. Konsentrasi Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb menurunkan jumlah sel spermatozoa

Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Konsentrasi Spermatozoa (juta/ml)

Ulangan	Perlakuan I	Perlakuan II
1	50	45
2	55	45
3	55	48
4	48	32
5	45	39

Setelah dianalisis dengan menggunakan uji - t, ternyata kelompok Perlakuan I menunjukkan jumlah sel spermatozoa yang lebih banyak dan berbeda dengan kelompok Perlakuan II ($P<0,05$). Lihat Gambar 5 (hal. 39).

BAB V
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu proses fertilisasi yang terjadi di luar tubuh dengan teknik yang diusahakan sama dengan fertilisasi *in vivo*. Fertilisasi *in vitro* membutuhkan : (1) sistem memanen sel telur secara efisien dan tidak merusak sel telur. (2) pematangan inti, sitoplasma dan sel-sel kumulus ooforus sel telur. (3) sistem kultur yang tidak merusak. (4) sistem untuk kapasitas spermatozoa. (5) kondisi yang efisien untuk melakukan fertilisasi (First and Parrish, 1987).

Proses fertilisasi *in vitro* meliputi penetrasi spermatozoa melalui kumulus ooforus, korona radiata, zona pelusida, dan masuk ke dalam vitelus ovum (Poernomo dkk, 2001). Pada penelitian ini yang lebih diperhatikan adalah penetrasi spermatozoa melalui kumulus ooforus. Penetrasi di kumulus ooforus memerlukan fasilitas pelepasan hyaluronidase. Hyaluronidase efektif menghidrolisis kumulus ooforus selanjutnya zona pelusida hanya dapat dihidrolisis oleh enzim proteolitik yaitu akrosin dan tidak dengan hyaluronidase. Spermatozoa mencapai zona pelusida awalnya dengan bagian kepala spermatozoa pada permukaan sel telur, selanjutnya dengan posisi paralel. Selama penetrasi di seluruh zona pelusida dan masuk ke subzona (perivitelin) dalam waktu beberapa menit (Liu and Baker, 1992).

Partodihardjo (1992) melaporkan, enzim hyaluronidase mendepolarisasi asam hyaluprotein, yaitu bahan perekat yang menyatukan sel-sel kumulus satu

sama lain. Penghapusan materi perekat tersebut melepaskan hubungan antara sel-sel kumulus tersebut. Setelah hubungan antar sel kumulus lepas, spermatozoa dapat menembus lapisan sel telur berikutnya. Apabila enzim ini dihambat, maka spermatozoa tidak melaksanakan fungsinya untuk membuka matriks kumulus ooforus sehingga tidak terjadi fertilisasi.

Penelitian ini didapatkan hasil pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 15,69 g/kg bb (Perlakuan II) tiap hari selama 53 hari ternyata tidak mengakibatkan hambatan penetrasi sel spermatozoa, tidak menurunkan motilitas spermatozoa, tidak menurunkan viabilitas spermatozoa tetapi menurunkan konsentrasi spermatozoa.

Hasil penelitian motilitas spermatozoa menunjukkan antara kelompok Perlakuan I dan kelompok Perlakuan II memperlihatkan motilitas yang baik yaitu spermatozoanya bergerak berupa gelombang kecil sampai besar yang tebal dan gelep dalam jumlah banyak dan bergerak cepat serta gerakan individu tergolong progresif berupa gerakan aktif maju ke depan (Soehadi dan Arsyad, 1982). Motilitas spermatozoa diperlukan agar spermatozoa dapat mencapai ovum untuk pembuahan dan bermigrasi sepanjang saluran reproduksi betina untuk mencapai tempat fertilisasi (Liu and Baker, 1992).

Hasil penelitian viabilitas spermatozoa menunjukkan kelompok Perlakuan I tidak berbeda nyata dengan kelompok Perlakuan II ($P > 0,05$). Spermatozoa yang mati permiabilitas membran selnya meningkat, terutama di daerah post-nuclear cups. Sehingga sel spermatozoa yang mati akan mudah menyerap zat warna. Sedang sel spermatozoa yang hidup tetap jernih (Hardijanto dkk., 1999).

Hasil penelitian konsentrasi spermatozoa menunjukkan kelompok Perlakuan I berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok Perlakuan II ($P < 0,05$). Spermatozoa merupakan tahap akhir dari spermiogenesis dan pada pembentukan menjadi spermatozoa ini yang menjadi target sel dari pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees akan menurunkan enzim hyaluronidase yang digunakan pada saat fertilisasi. Penghambatan ini mengakibatkan secara morfologis bentuk spermatozoa tidak sempurna. Ketidaktersempurnaan bentuk ini mengakibatkan sel spermatozoa berkurang jumlahnya dan banyak yang mati. Sel spermatogenik akan dilisis oleh sel sertoli yang bersifat fagosit (Hafez, 1993).

Pada pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat menurunkan kadar testosteron tikus. Pada daun diketahui komponen dominan adalah flavonoid yang bersifat sitotoksik. Testosteron selain berfungsi menjaga integritas sel-sel kelamin jantan juga berfungsi pada aktifitas mitosis dan meiosis. Bila kadar testosteron berkurang akan mengakibatkan penurunan konsentrasi sel spermatozoa (Huda, 2001).

Pada penelitian pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb terhadap morfologi akrosom pada spermatozoa mencit secara *in vitro* menunjukkan kerusakan sebagian besar morfologi sperma. Hal ini disebabkan oleh adanya zat - zat yang bersifat sitotoksik dalam tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees yang dapat mempengaruhi proses spermatogenesis (Setiyowati, 2001).

Hasil pengamatan terhadap fertilisasi *in vitro* ternyata pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2$ LD₅₀ tidak dapat menghambat penetrasi sel spermatozoa. Sedangkan pada penelitian penggunaan ekstrak metanol daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan berbagai dosis mampu menghambat penetrasi spermatozoa. Hal ini dikarenakan flavonoid yang terkandung dalam daun *Gendarussa vulgaris* Nees dapat berfungsi sebagai inhibitor enzim hyaluronidase. Enzim hyaluronidase berfungsi membuka matriks kumulus ooforus dengan jalan melarutkan asam hyalurona. Apabila enzim ini dihambat, maka spermatozoa tidak dapat melaksanakan fungsinya untuk membuka matriks kumulus ooforus sehingga tidak terjadi fertilisasi (Padmawati, 2000).

Zat yang terkandung dalam daun *Gendarussa vulgaris* Nees yang berfungsi untuk menghambat penetrasi sel spermatozoa pada kumulus ooforus menciit adalah C - glikosida flavonoid (Padmawati, 2000). C - glikosida flavonoid merupakan senyawa kimia yang dapat larut dalam air tetapi lebih larut dalam pelarut golongan alkohol. Karena C - glikosida flavonoid memiliki rantai C (karbon) yang panjang. Senyawa kimia yang memiliki rantai C yang panjang mempunyai sifat kimia yang lebih larut dengan pelarut golongan alkohol seperti : butanol, metanol, etanol daripada pelarut air (Marlina, 2001).

Pada penelitian ini menggunakan pelarut air yang mengakibatkan zat yang terangkat dalam proses ekstraksi tidak dapat maksimal. Sehingga pada pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis $1/2$ LD₅₀ tidak dapat

menghambat fertilisasi. Hal ini mungkin disebabkan karena dosis dari zat yang mampu menghambat terjadinya fertilisasi yaitu flavonoid kurang.

Berdasarkan hasil penelitian di atas, pemberian ekstrak air dengan dosis 15,69 g/kg bb ($1/2 LD_{50}$) tidak dapat menyebabkan hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit. Hal ini disebabkan dosis dari zat yang dapat menghambat penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus yaitu flavonoid kurang.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 15,69 g/kg bb (1/2 LD₅₀) tiap hari selama 53 hari dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 1/2 LD₅₀ tidak dapat menghambat penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit.
2. Pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan dosis 1/2 LD₅₀ tidak dapat menurunkan kualitas spermatozoa berupa motilitas dan viabilitas spermatozoa tetapi menurunkan konsentrasi spermatozoa.

VI.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan pelarut yang dapat mengangkat flavonoid secara maksimal, sehingga dapat menghambat penetrasi spermatozoa serta menurunkan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa.

RINGKASAN

RINGKASAN

ALFI ZUMAROH. "Efek pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit dengan metode *IVF*" dibawah bimbingan Dr. Bambang Poernomo S., M.S., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Dr. RTS Adikara, M.S., drh. sebagai pembimbing kedua.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian *per oral* ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus serta terhadap kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa mencit.

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit galur Balb/c berumur 4-5 bulan yang telah dilakukan uji fertilitas. Mencit tersebut kemudian dibagi menjadi dua kelompok. Masing- masing kelompok terdiri dari lima ekor (ulangan) dengan perlakuan sebagai berikut. Kelompok Perlakuan I diberi aquadestilata dan kelompok Perlakuan II diberi ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb (1/2 LD₅₀). Pemberian dilakukan tiap hari selama 53 hari. Selanjutnya sperma diambil dari masing-masing kelompok untuk fertilisasi *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada pengaruh pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris* Nees dosis 15,69 g/kg bb terhadap hambatan penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus mencit. Tidak adanya hambatan penetrasi spermatozoa tersebut disebabkan dosis dari zat yang dapat menyebabkan hambatan penetrasi spermatozoa yaitu flavonoid kurang. Selain tidak

menghambat penetrasi spermatozoa, juga tidak menurunkan motilitas spermatozoa dan tidak menurunkan viabilitas spermatozoa. Namun pada dosis tersebut ternyata dapat menurunkan konsentrasi spermatozoa.

Berdasarkan penelitian ini, disarankan bahwa perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan pelarut yang dapat mengangkat flavonoid secara maksimal, sehingga dapat menghambat penetrasi spermatozoa serta dapat menurunkan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

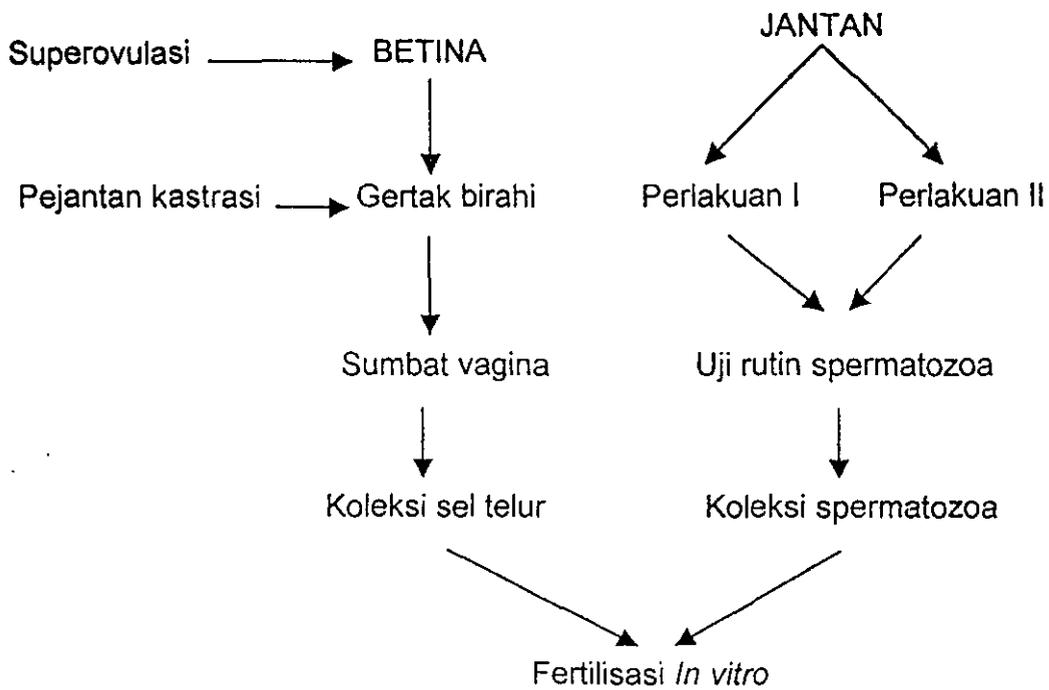
- Adimulya, A. 1987. Prospek Penelitian dalam Bidang Andrologi Untuk Menunjang NKKBS, dalam Simposium Genetika dan Andrologi. Bandung.
- Anonim, 1983. TOGA (Tanaman Obat Keluarga). Direktorat Pengawasan Obat Tradisional Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan Depkes RI. Jakarta. 33.
- Anonim, 1999. Monograph on Selected Medical Plants, WHO. Edisi I Geneva. 1.
- Backer, C.A. and R.B.C. Van den Brink. 1965. Flora of Java. Vol.1. Groningen. Netherland. 589-590.
- Didiet, E, 1988. Studi Fitokimia dan Farmakognosi Daun Gondorosso (*Justicia gendarussa* Burm f.). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- First, N.L. and J.J. Parrish. 1987. *In vitro* Fertilisation of Ruminant. J. Reproduction Fertility. 151-165.
- Fransworth, N.R. and D.P. Waller. 1982. Current Status of Plant Products Reported. Inhibit Sperm. Research Frontiers in Fertility Regulation. 2 (1):12.
- Gilbert, E.S.E. 1988. Developmental Biology. Edisi ke dua Sinauer Association Inc. Publisher. Sunderland. Massachusetts. Hal. 313-330.
- Hafez, E. S.E. 1993. Folliculogenesis, Egg Maturation and Ovulation; Transport and Survival of Gametes; Fertilization. In Reproduction in Farm Animal. Hafez Edition G. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hardidjanto, T. Sardjito, T. Hernawati, H. Susilowati, T.W. Suprayogi. 1999. Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan Yayasan Sarana Waru Jaya. 1759.
- Huda , K.I. 2001. Penggunaan Fraksi N-Butanol *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Kualitas Spermatozoa Pada Epididimis Mencit (*Musmusculus*) Jantan. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 23.

- Kusriningrum. 1989. Dasar Perencanaan dan Rancangan acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 53-92.
- Li, M.W., A.I. Yudin, C.A Vandevoort, K. Sabeur, P. Primakoff, and J.W. Overstreet. 1997. Inhibition of Monkey Sperm Hyaluronidase Activity and Heterologous Cumulus Penetration by Flavonoids. California Regional Primate Research Center. Departemen of Obstries and gynecology.
- Linker, A. 1971. Hyaluronidase. Method of Enzymatic Analysis (HU Bergmayer, ED). Edisi kedua. Vol.2. Verlag Chemic. Wheinhem Academic Press. New york. 943-948.
- Liu, D.Y. and Baker, H.W.G. 1992. Test of Human Sperm Function and Fertilisation *In vitro*. of Fertility and Sterility. 82 (3). 472-473.
- Marliana, D.M. 2001. Uji Toksisitas Akut dan Subakut Ekstrak Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap Hepar dan Ginjal Mencit (*Mus musculus*). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 38-39, 62-63.
- Moeso, S dan Agus, P. 1985. Laporan Perjalanan ke Jayapura (Irian Jaya). Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 19.
- Meyer, K., Hoffman and A. Linker. 1960. Hyaluronidase : The Enzymes. Edisi kedua. Vol. 4. Academic Press. New york. 447-459.
- Morse, H.C. 1981. The Laboratory Mouse a Historical Perspective, in The Mouse in Biomedical Research. Vol I. Editor Hendry L. Foster dkk. Academic Press Inc. Boston. 1.
- Padmawati, I.G.A. 2000. Pengaruh Fraksi N-Butanol *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Penurunan Fungsi Penetrasi Pada Mencit Dengan Metode Fertilisasi *In vitro* (IVF). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan. Jurusan reproduksi. Institut Pertanian Bogor. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Poemomo, B.S., M. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1995. Diktat Pengantar Anatomi, Histologi dan Fisiologi Reproduksi Jantan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 36 – 40.
- Poemomo, B.S., M. Marruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 2001. Diktat Ilmu Mudigah. Pengantar Ilmu Mudigah. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 45-46.

- Prajogo, E.W.B., K Emmy, Suhartono, R Imam, I Noor dan I.G.P. Santa. 1994. Bioactivity Study on Decoction and Ekstracts Of *Justicia Gendarussa* Burm.F. ASOMP VIII UNESCO. Malaka. Malaysia.
- Prajogo, E.W.B., A Hinting dan Widjiati. 1997^a. Efek Inhibitor Fraksi Diklormetan dan Metanol dari *Justicia gendarussa* Burm F. Terhadap enzim Hyaluronidase Mencit. dalam Simposium Penelitian Bahan Obat Alam IX. Yogyakarta. 2-33.
- Prajogo, E.W.B., Khoirila., IGP Santa dan Soeharno. 1997^b. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaaris* Nees Terhadap Spermatogenesis Mencit. dalam Simposium Penelitian Bahan Obat alami IX. Yogyakarta.
- Setiyowati, R. 2001. Pengaruh Pemberian Infus Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Perubahan Morfologi Akrosom Pada Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) *In vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 35.
- Siti,S. 1995. Khasiat Gandarusa Sebagai Obat Tradisional. Warta Apimap Indonesia. V(1). 8-9.
- Smith, J.B. dan Mangkoewidjoyo, S. 1998. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Universitas Indonesia. Jakarta. 10-11.
- Soehadi, K. dan Arsyad, K.M. 1982. Analisis Sperma. Airlangga University Press. Surabaya. 16.
- Steenis, C.G.G.J.V. 1978. Flora. Cetakan kedua. Pradya Paramita. Jakarta. 393.
- Sugiyono. 2001. Statistik Non Parametrik untuk Penelitian. Alfabeta. Bandung.
- Van Steen, C.G.G.J.P den Hoed, S. Bloembergen and P.J. Eyma. 1987. Flora: Untuk Sekolah Di Indonesia. Pradya Paramita. Jakarta.
- Warren, C. and Bown, F. 1986. General Statistics. Second Edition. Wiley. New york. 411-418.
- Whittingham, D.G. and Wood, M.J. 1992. Reproductive Phisiology dalam : The Mouse In Biomedical Research. Vol. III. Academic Press. Inc. Boston. 140.

GAMBAR

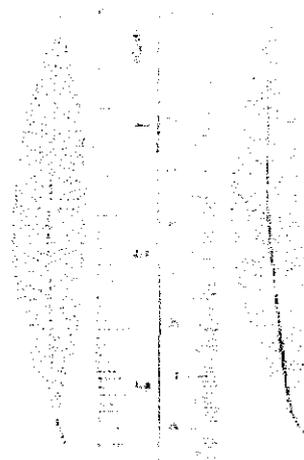
RANCANGAN PENELITIAN



Gambar 2. Skema Rancangan Penelitian



Gambar 3. Tanaman *Gendarussa vulgaris* Nees.



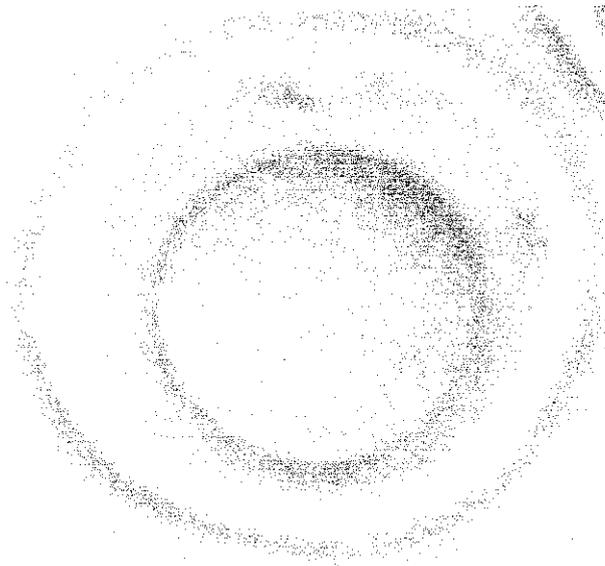
Gambar 4. Sediaan Uji Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Nees



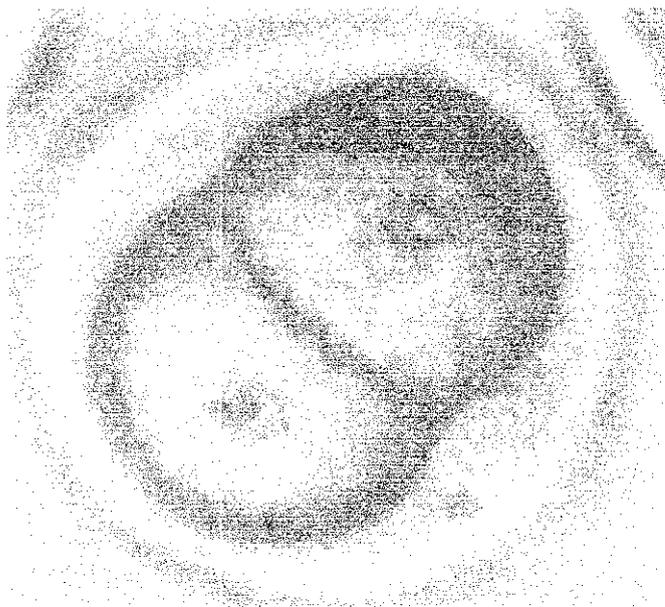
Gambar 5. Spermatozoa yang telah mendapat perlakuan II tidak mengalami perubahan (400 x)



Gambar 6. Proses Fertilisasi *In Vitro* (400 x)



Gambar 7. Terbentuknya Zigot Hasil Perlakuan II
(Kondisi Normal) (400 X)



Gambar 8. Zigot Berkembang Menjadi Dua Sel
Hasil Perlakuan II (Kondisi Normal) (400 X)

LAMPIRAN

LAMPIRAN

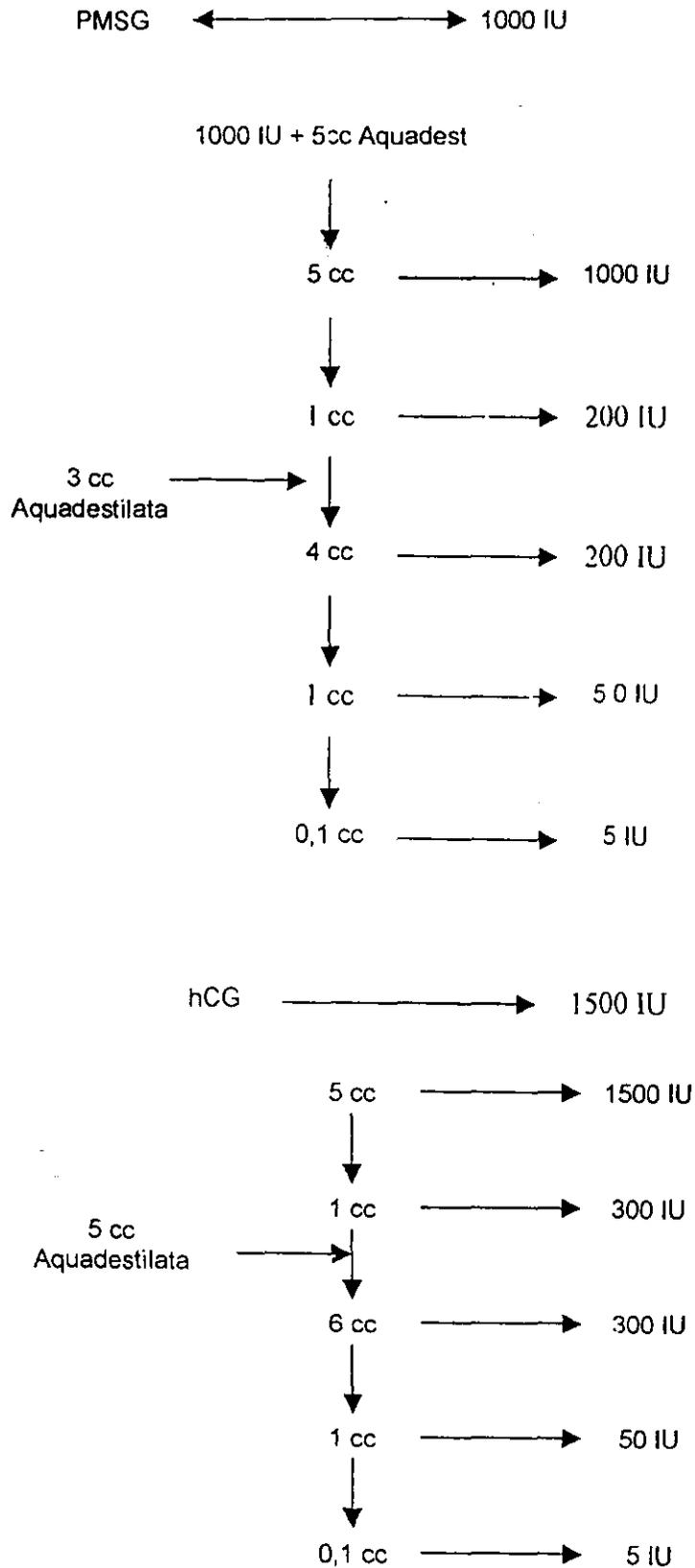
Lampiran 1. Medium M₁₆

No.	Nama Senyawa	μ l	Gram/liter
1.	NaCl		5,333
2.	KCl		0,356
3.	CaCl ₂ ·2H ₂ O		0,252
4.	MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,293
5.	NaHCO ₃		2,101
6.	Na Laktat 69%	2840	
7.	Na Piruvat		0,036
8.	KH ₂ PO ₄		0,162
9.	Glukosa		1,000
10.	Bovine Serum Albumin		4,000
11.	Penicilin		0,060
12.	Streptomisin		0,050
13.	Aquabidest		1 l
14.	Fenol Red		0,010

Lampiran 2. Medium Phosphat Buffer Saline (PBS)

No.	Nama Senyawa	Gram/200 ml
1.	PBS Powder	1,92
2.	Glukosa	0,20
3.	Na Piruvat	0,0072
4.	Penicilin	0,0212
5.	Streptomisin	0,010
6.	Bovine Serum Albumin	3,0 %

Lampiran 3. Penghitungan Dosis Super Ovulasi



Lampiran 4. Pembuatan Drop Untuk Medium Kultur

Pembuatan medium kultur dilakukan dengan cara :

1. Disiapkan cawan petri steril untuk medium kultur dan untuk drop pencucian oosit .
2. Cawan untuk medium kultur diisi dengan lima drop medium M_{16} yang ditutup (difiksasi) dengan minyak mineral, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 (1 drop = 25 μL)

Untuk pencucian oosit juga dibuat drop PBS dan drop M_{16} dalam cawan petri masing-masing sebanyak tiga drop yang ditutup dengan minyak mineral, kemudian diinkubasi dalam inkubator (1 drop = 50 μL).

Lampiran 5. Uji Fertilitas dan Uji Anti Fertilitas Mencit Jantan**Uji Fertilitas Mencit Jantan**

Seluruh mencit jantan yang akan digunakan sampel percobaan penelitian dikawinkan secara alami dengan mencit betina yang sebelumnya sudah dilakukan superovulasi dengan metode “ single mating “. Hanya mencit jantan yang terbukti fertil yang digunakan sebagai sampel percobaan

Uji Anti Fertilitas

Dosis Pembuatan sediaan. Satu bagian zat dilarutkan dalam sejumlah air suling sampai larut sempurna. Dosis diberikan dalam mg zat/g berat badan mencit. Berat badan mencit adalah berat badan yang diperoleh dari penimbangan setiap hari. Lama pemberian larutan disesuaikan dengan 1,5 kali siklus spermatogenesis mencit (53 hari).

Lampiran 6. Pengambilan Spermatozoa Mencit

Pengambilan spermatozoa mencit jantan dilakukan dengan cara :

1. Mencit dibunuh dengan cara dislokasio leher
2. Disinfeksi dengan alkohol 70 %, kemudian skrotum dibedah dengan cepat
3. Testis kanan dan kiri ditarik
4. Sperma diambil dengan memotong bagian kauda epididimis
5. Cuci dengan PBS kemudian lanjutkan dengan mencuci menggunakan medium

M₁₆

Lampiran 7. Analisis Data Uji - Fisher Exact Probability Efek Pemberian Extract Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Hambatan Penetrasi Spermatozoa pada Cumulus oophorus Mencit dengan Metode Fertilisasi *In vitro*

Kelompok	Fertilisasi	Tidak terjadi fertilisasi	Jumlah
I	5	-	5
II	5	-	5
Jumlah	10	-	10

$$P = \frac{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)}{N!A!B!C!D!}$$

$$= \frac{(5+0)(5+0)(5+5)(0+0)}{10!5!0!5!0!}$$

$$= \frac{0}{0} = 0.$$

$P < 0,05$ berarti H_0 diterima. Dengan demikian tidak ada perbedaan antara kelompok Perlakuan I dengan kelompok Perlakuan II.

Lampiran 8. Analisis Data Uji - Mann Whitney Pengamatan terhadap Motilitas Spermatozoa

Ranks

	Jenis Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil Penelitian	1	5	5.50	27.50
Motilitas Sperma	2	5	5.50	27.50
	Total	10		

Test Statistics^b

	Hasil Penelitian Motilitas Sperma
Mann-Whitney U	12.500
Wilcoxon W	27.500
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable:
Jenis Perlakuan

Lampiran 9. Analisis Data Uji - t Pengamatan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Group Statistics

	Jenis Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil Penelitian Viabilitas Sperma dalam %	Perlakuan 1	5	63.4780	5.4635	2.4434
	Perlakuan 2	5	58.7440	3.7048	1.6569

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
Hasil Penelitian Viabilitas Sperma dalam %	Equal variances assumed	.374	.558	1.604	8	.147	4.7340	2.5521	-2.0737	11.5417
	Equal variances not assumed			1.604	7.037	.153	4.7340	2.9521	-2.2394	11.7074

Lampiran 10. Analisis Data Uji – t Pengamatan terhadap Konsentrasi Spermatozoa

Group Statistics

	Jenis Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil Penelitian Konsentrasi Spermatozoa dalam juta/ml	Perlakuan 1	5	50.60	4.39	1.96
	Perlakuan 2	5	41.80	6.38	2.85

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
Hasil Penelitian Konsentrasi Spermatozoa dalam juta/ml	Equal variances assumed	.905	.369	2.540	8	.035	6.80	3.46	.81	16.79
	Equal variances not assumed			2.540	7.097	.038	8.80	3.46	.63	16.97