

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN INFUS DAUN *Gendarussa vulgaris Nees*
TERHADAP PERUBAHAN MORFOLOGI AKROSOM PADA
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*) *IN VITRO***



Oleh :

RINI SETIYOWATI
SURABAYA-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH PEMBERIAN INFUS DAUN *Gendarussa vulgaris* Nees
TERHADAP PERUBAHAN MORFOLOGI AKROSOM PADA
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*) *In Vitro***

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

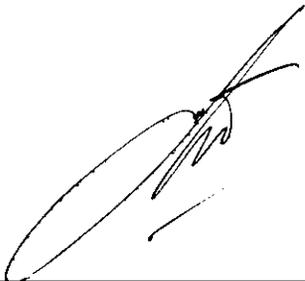
oleh

RINI SETIYOWATI

069612332

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Dr. Chaerul Anwar Nidom, M.S., Drh.

Pembimbing Pertama



Husni Anwar, 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,



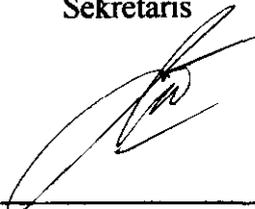
Rr. Sri Pantja Madyawati, M. Si., Drh.
Ketua



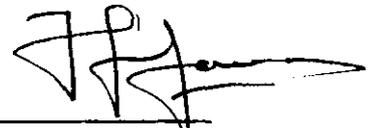
Lilik Maslachah, M. Kes., Drh.
Sekretaris



Widjiati, M. Si., Drh.
Anggota



Dr. Chaerul Anwar Nidom, M. S., Drh.
Anggota



Husni Anwar, Drh.
Anggota

Surabaya, 9 Januari 2002

Fakultas Kedokteran hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, M. S., Drh.
NIP. 130687297

**PENGARUH PEMBERIAN INFUS DAUN *Gendarussa vulgaris* Nees
TERHADAP PERUBAHAN MORFOLOGI AKROSOM PADA
SPERMATOZOA MENCIT (*Mus musculus*) *In Vitro***

Rini Setiyowati

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*. Hewan percobaan yang digunakan terdiri dari 15 ekor mencit jantan galur Balb C umur empat sampai lima bulan dengan berat badan 20-25 g, yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian dilakukan dengan model percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit jantan tersebut dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan, masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor mencit. Tiga kelompok perlakuan tersebut adalah kelompok kontrol negatif (pada fertilisasi *in vitro* spermatozoa tidak dicampur sel telur), kontrol positif (pada fertilisasi *in vitro* spermatozoa dicampur sel telur) dan kelompok perlakuan infus daun. Pada kelompok kontrol, masing-masing diberi aquadest 0,5 ml sedangkan pada perlakuan infus daun diberikan dosis sebesar 15,69 g/Kg Berat Badan (BB) dalam pelarut aquadest 0,5 ml. Perlakuan diberikan secara oral selama 53 hari. Setelah itu dilakukan pemanenan spermatozoa pada masing-masing kelompok, kemudian dimasukkan kedalam medium M₁₆ yang berisi sel telur. Setelah kurang lebih tiga jam spermatozoa yang menggerombol pada sel telur diambil, lalu dilakukan pemeriksaan perubahan akrosom dengan prosedur pemeriksaan rutin menggunakan Scanning Electron Microscopy (SEM). Hasil pemeriksaan dianalisis menggunakan analisis Kruskal Wallis dengan derajat kepercayaan 5% , yaitu terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah S.W.T. atas karunia-Nya, sehingga penyusunan skripsi yang berjudul "Pengaruh Pemberian Infus Daun *Gendarussa vulgaris Nees* Terhadap Perubahan Morfologi Akrosom Pada Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) *In Vitro*" ini dapat terselesaikan.

Dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Chairul Anwar Nidom, M.S., Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak Husni Anwar, Drh. selaku pembimbing kedua yang telah memberikan kepercayaan, dukungan moral, nasehat serta kesediaan waktu dalam membimbing penulis.

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

Demikian pula penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada Ayahanda dan Ibunda serta Suami dan Ananda tercinta yang merupakan "Nur" dalam penyelesaian skripsi ini.

Terima kasih tidak lupa penulis sampaikan kepada Bapak Supardi, Bapak Sukadi, Mas Iwan, Prof. Dr. Santoso, Dr. I Ketut Sudiana, Bapak Suharsono, M.S., Drh., Ibu Endah, Mas Muchid, Rekan Herry, Heru WHS, Dian, Ida, Alfi, Mufid, Adik Henny, Sugik dan semua pihak yang telah memberikan bantuannya dalam penyusunan skripsi ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik, saran serta tambahan informasi guna penyempurnaan skripsi ini sehingga dapat bermanfaat bagi yang memerlukan.

Surabaya, Desember 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Landasan Teori.....	3
1.4. Tujuan Penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
1.6. Hipotesis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Tinjauan Tentang Tanaman <i>Gendarussa vulgaris Nees</i> ...	6
2.1.1. Klasifikasi Tanaman.....	6
2.1.2. Nama Daerah.....	7
2.1.3. Penyebaran Dan Tempat Tumbuh.....	7
2.1.4. Morfologi Tanaman.....	7
2.1.5. Kegunaan Tanaman.....	8
2.2. Tinjauan Tentang Senyawa Flavonoid.....	9
2.3. Tinjauan Tentang Mencit.....	10
2.4. Sistem Reproduksi.....	11
2.4.1. Sistem Reproduksi Hewan Jantan.....	11

2.4.1.1. Testis.....	11
2.4.1.2. Saluran Kelamin Dengan Kelenjar Kelamin.	12
a. Epididimis.....	12
b. Vas deferens atau duktus deferens.....	12
c. Uretra.....	12
d. Kelenjar-kelenjar assesoris.....	12
2.4.1.3. Pembentukan Sel Kelamin Jantan (Spermatozoa).....	13
2.4.1.4. Fungsi Spermatozoa.....	16
2.4.1.4.1. Migrasi.....	16
2.4.1.4.2. Binding.....	16
2.4.1.4.3. Penetrasi.....	17
2.4.2. Sistem Reproduksi Hewan Betina.....	17
2.4.2.1. Ovarium.....	17
2.4.2.2. Saluran kelamin dan alat penggantungnya.....	18
2.4.2.2.1. Tuba falopii/oviduk.....	18
2.4.2.2.2. Rahim/Uterus.....	18
2.4.2.2.3. Vagina.....	19
2.5. Fertilisasi.....	19
2.6. Fertilisasi <i>In Vitro</i>	20
2.7. Tinjauan Tentang Reaksi Akrosom.....	21
2.8. Tinjauan Tentang Scanning Electron Microscopy (SEM)...	22

BAB III	MATERI DAN METODE.....	24
	3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
	3.2. Bahan dan Materi Penelitian.....	24
	3.2.1. Bahan Penelitian.....	24
	3.2.2. Alat Penelitian.....	25
	3.3. Metode Penelitian.....	25
	3.3.1. Pembuatan Sediaan Uji.....	25
	3.3.2. Penghitungan Dosis Infus Daun.....	27
	3.3.3. Persiapan Hewan Percobaan.....	27
	3.3.4. Perlakuan Hewan Percobaan.....	28
	3.4. Rancangan Penelitian.....	30
	3.5. Peubah yang Diamati.....	30
	3.6. Analisis Data.....	31
BAB IV	HASIL PENELITIAN.....	32
BAB V	PEMBAHASAN.....	33
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
	6.1. Kesimpulan.....	36
	6.2. Saran.....	36
	RINGKASAN.....	37
	DAFTAR PUSTAKA.....	39
	GAMBAR.....	44
	LAMPIRAN.....	50

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Skema Pembuatan Sediaan Uji.....	26
2. Skema Rancangan Penelitian.....	45
3. Tanaman <i>Gendarussa vulgaris</i> Nees.....	46
4. Bagian Tanaman Yang Diuji.....	46
5. Cara Pemberian Perlakuan Pada Mencit.....	46
6. Proses Pembentukan Spermatozoa.....	47
7. Scanning Electron Microscopy (SEM).....	48
8. Perubahan Akrosom Pada Perlakuan Infus Daun.....	49
9. Perubahan Akrosom Pada Kontrol Positif.....	50
10. Perubahan Akrosom Pada Kontrol Negatif.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Medium M16.....	53
2. Medium Phospat Buffer Saline (PBS).....	54
3. Penghitungan Dosis Super Ovulasi.....	55
4. Preparasi Electron Microscopy (SEM).....	56
5. Analisis Kruskal Wallis Pengaruh Pemberian Infus Daun <i>Gendarussa vulgaris</i> <i>Nees</i> Terhadap Perubahan Morfologi Akrosom Pada Spermatozoa mencit (<i>Mus musculus</i>) <i>In Vitro</i>	57

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

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

Menurut data laporan dari Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional bahwa pada tahun 1998 di Indonesia terdapat 36 juta pasangan usia subur. Dari jumlah tersebut 26 juta pasangan pernah menggunakan kontrasepsi dan sebagian besar adalah wanita sebagai akseptor KB, sedangkan pihak suami hanya sedikit partisipasinya. Hal ini mungkin karena alat dan bahan kontrasepsi pria tidak banyak jenisnya seperti pada wanita, sehingga alternatif pilihan belum lengkap.

Perkembangan metode kontrasepsi untuk pria jauh ketinggalan dibandingkan dengan kontrasepsi untuk wanita, hal ini disebabkan oleh banyaknya faktor yang terkait. Sampai saat ini penelitian penggunaan kontrasepsi pria terus diupayakan untuk menghasilkan suatu metode kontrasepsi yang ideal, dalam arti berdaya guna, aman, murah, mudah didapat, mempunyai efek samping minimal, bersifat reversibel dan tidak memerlukan motivasi terus-menerus (Affandi, 1992).

Sebelum obat diaplikasikan pada manusia perlu diadakan uji sub klinis pada hewan coba. Menurut (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988) hewan coba yang sesuai untuk penelitian obat antifertilitas adalah mencit.

Salah satu usaha pemerintah dalam mencari alat kontrasepsi pria adalah dengan memanfaatkan tanaman yang mengandung senyawa aktif yang mempunyai khasiat antifertilitas (Sutarjadi, 1983). Keuntungan dalam pengembangan obat dari tanaman adalah bukan merupakan hasil sintesis seperti obat modern, penggunaan tanaman untuk menunjang kesehatan banyak didasari pada pengetahuan empiris dan efek sampingnya rendah (Prayogo dkk., 1997).

Salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai obat kotrasepsi pada pria adalah *Gendarussa vulgaris Nees* (Moeso dan Agus, 1985). Pada penelitian pendahuluan oleh Didiet (1988) dan Cholies (1988), diketahui bahwa tanaman tersebut mengandung senyawa flavonoid, iridoid, alkaloid, triterpan, steroid dan minyak atsiri, ternyata yang mempunyai efek antifertilitas adalah senyawa flavonoid.

Senyawa flavonoid mempunyai khasiat sebagai spermasidal dan bersifat sitotoksik (Marby *et al.*, 1970, Harbone, 1973, Markham, 1988). Sifat sitotoksik inilah yang mempunyai efek spermasidal.

1.2. Perumusan Masalah

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

Apakah pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* berpengaruh terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.

1.3. Landasan Teori

Dari hasil studi eksplorasi dipedalaman Irian Jaya, diketahui terdapat tanaman yang digunakan untuk menjarangkan kelahiran, yaitu *Gendarussa vulgaris Nees* yang khusus diberikan pada pria (Moeso dan Agus, 1985) dengan cara meminum rebusan akar dan daunnya dua kali dalam sebulan.

Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* dapat menurunkan kadar testosteron dalam serum tikus (Prayogo dkk., 1994). Disamping itu juga dapat mempengaruhi spermatogenesis tikus (Yugo dan Lukman, 1998). Fraksi diklormetan dan metanol daun *Gendarussa vulgaris Nees* dapat menghambat spermatogenesis dengan efek penurunan jumlah sel-sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa (Prayogo dkk., 1997). Disamping itu juga dapat menurunkan motilitas, viabilitas spermatozoa kelinci, mencit (Hartati dkk.,1997) dan manusia *in vitro* (Wahyudi dkk., 1997) serta menurunkan daya dispersi cumulus oophorus manusia *in vitro* (Lestari dkk., 1997). Selain itu diketahui pula bahwa ekstrak metanol *Gendarussa vulgaris Nees* dapat menghambat spermatozoa mencit, menurunkan

Akrosin dan α -glukosidase kelinci (Prayogo dkk., 1998). Sedangkan pada penentuan LD₅₀ dari infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* pada tikus diketahui bahwa tanaman ini termasuk kategori praktis tidak toksik dengan harga LD₅₀ 64,206 mg/Kg BB (Wahjoedi,B., 1987).

Penurunan kadar enzim akrosin yang disebabkan adanya bahan-bahan yang bersifat sitotoksik pada tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* berarti ada bagian yang terganggu pada spermatozoa. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- Mengetahui pengaruh pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.
- Melakukan penelitian lanjutan tentang tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* sebagai obat antifertilitas pada pria.
- Pengaplikasian obat antifertilitas pada pria dari tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* sebagai obat antifertilitas pada hewan.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.

1.5. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

“Pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees menyebabkan perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.”

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Tanaman *Gendarussa vulgaris Nees*

2.1.1. Klasifikasi Tanaman

Secara taksonomi tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* tergolong dalam :

Devisi	: Spermatophyta
Sub devisi	: Angiospermeae
Kelas	: Dicotyledanae
Sub Kelas	: Sympelate
Ordo	: Scophulariales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Gendarussa</i>
Spesies	: <i>Gendarussa vulgaris Nees</i>
Sinonim	: <i>Justicia gendarussa vulgaris Burm.f.</i> <i>Justicia dahora (Buch) Ham</i> <i>Justicia vulgaris Lour</i> <i>Justicia salicina Vahl</i> (Becker dan R.C.B. Van den Brink, 1965).

2.1.2. Nama Daerah

Gendarussa vulgaris Nees mempunyai nama-nama daerah sebagai berikut :

- Sumatera (Aceh) : besi-besi
Malayu : gandarusa
Sunda : handarusa
Jawa : gandarusa, tetehan, kus
Madura : ghandarusa
Bima : gandarisa
Maluku (Ternate) : puli (Heyne, 1987 ; Siti, 1995).

2.1.3. Penyebaran Dan Tempat Tumbuh

Tempat tumbuh asal tanaman ini tidak diketahui, daerah penyebarannya terutama didaerah tropis termasuk Indonesia. Di Jawa terdapat didataran rendah sampai ketinggian 500 m dari permukaan laut. Pada umumnya ditanam sebagai pagar hidup dan juga tumbuh liar secara lokal dibatas kawasan hutan dan tanggul sungai (Siti, 1995; Steenis, 1987).

2.1.4. Morfologi Tanaman

Gendarussa vulgaris Nees merupakan tanaman setengah perdu tegak, sering bercabang banyak, tingginya kira-kira 0,7 – 1,8 m.

Batang : segi empat, tumpul atau cukup bulat, yang muda ungu, yang tua coklat.

- Daun : tangkai daun 5 – 8 mm, helai daun berbentuk lancet, beringgit lebar dan tidak dalam.
- Bunga : berkumpul dalam malai sangat sempit, 3 – 12 cm panjangnya yang tersusun dari anak payung mengapu yang rata, daun pelindung kecil sempit, runcing, dan boleh dikatakan sama. Mahkota gundul, tabung pucat, berbintik ungu. Pinggiran mahkota berbibir dua, bibir bawah berbentuk baji hingga bulat 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 : berbentuk gada, gundul, berbiji 4. (Van Steen *et al.*,1987; Anonimus, 1999).

2.1.5. Kegunaan Tanaman

Gendarussa vulgaris Nees sering digunakan sebagai bahan ramuan obat tradisional, bagian tanaman yang digunakan pada umumnya adalah akar dan daun.

Daun : digunakan sebagai obat encok, obat sakit kepala, obat sakit punggung, bisul, dan memar, juga untuk keseleo dan rematik.

Akar : sebagai obat malaria (Siti, 1995; Anonimus, 2001).

Akar dan daun, sebagai obat untuk menjarangkan kelahiran. Ramuan dibuat dengan merebus akar dan daunnya, kemudian airnya diminum dua kali dalam sebulan (Moeso dan Agus, 1985).

2.2. Tinjauan Tentang Senyawa Flavonoid

Salah satu bahan yang berkhasiat sebagai obat antifertilitas pada tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* adalah flavonoid (Didiet dan Cholies, 1988).

Menurut perkiraan, kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuh-tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya (Smith, 1972). Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga bisa ditemukan pula pada setiap ekstrak tumbuhan. Dalam tumbuhan, flavonoid umumnya terikat pada gula sebagai glikosida (Harborne, 1996) dan dalam bentuk aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) dalam berbagai bentuk struktur.

Menurut (Li *et al*, 1997) senyawa flavonoid dapat menurunkan daya dispersi kumulus oophorus pada mencit *in vitro* dan dapat menghambat penetrasi spermatozoa ke kumulus oophorus tupai.

Menurut (Fransworth dan Walter, 1982) terdapat bahan-bahan aktif yang dapat menghambat enzim hyaluronidase spermatozoa yang diperlukan dalam fertilisasi, salah satunya adalah glikosida flavonoid. Khusus tentang hambatan terhadap enzim spesifik pada spermatozoa yang berperan dalam proses fertilisasi antara lain yang sangat penting adalah hyaluronidase, akrosin dan penetrasi korona. Ketiga enzim tersebut terdapat pada akrosom dibagian kepala spermatozoa (Gilbert, 1988).

Masing-masing enzim mempunyai peranan yang penting dalam fertilisasi. Hyaluronidase berfungsi untuk membuka matrik kumulus oophorus dengan jalan melarutkan asam hyaluronik. Akrosin berperan menembus zona pelisida, sedangkan

enzim penetrasi korona berperan dalam penetrasi spermatozoa pada lapisan korona radiata (Prayogo dkk., 1997; Widjiati dkk., 1999). Apabila enzim hyaluronidase dihambat, maka spermatozoa tidak dapat melaksanakan fungsinya untuk membuka matrik kumulus oophorus, sehingga tidak terjadi fertilisasi. Hambatan ini juga berpengaruh terhadap enzim lain pada akrosom yang berperan pada proses fertilisasi.

2.3. Tinjauan Tentang Mencit

Hewan coba yang sesuai untuk penelitian obat antifertilitas adalah mencit (Smith dan Mangkoewidjojo, 1986). Mencit dengan nama latin *Mus musculus* merupakan hewan percobaan yang banyak digunakan dalam penelitian biomedik modern. Banyak varietasnya, ukuran yang sesuai, subur, waktu penyiapan pendek, dan mudah pemeliharaanya (Morse, 1981). Lama hidup mencit satu sampai dua tahun, tetapi ada pula yang mencapai tiga tahun. Umur dewasa 35 hari, kawin 8 minggu, berat dewasa anatra 20 – 40 gram (jantan) dan 18 – 35 gram (betina) (Smith, 1988).

Pada mencit proses spermatogenesis membutuhkan waktu kira-kira 8 hari, meiosis lengkap diperkirakan 13 hari dan spermiogenesis kira-kira 13,5 hari (Whittingham, 1992). Jadi proses spermatogenesis pada mencit membutuhkan waktu \pm selama 35 hari.

2.4. Sistem Reproduksi

2.4.1. Sistem Reproduksi Hewan Jantan

2.4.1.1. Testis

Testis merupakan organ primer yang berjumlah dua buah dan pada ternak mamalia secara normal terdapat didalam kantung luar yang disebut skrotum. Fungsi testis adalah :

1. Menghasilkan sel-sel kelamin jantan atau spermatozoa.
2. Mengekskresikan hormon kelamin jantan atau testosteron.

Spermatozoa dihasilkan didalam tubulus seminiferus atas pengaruh FSH (*Folicle Stimulating Hormone*), sedangkan testosteron diproduksi oleh sel-sel interstitial dari leydig atas pengaruh ICSH (*Interstitial Cell Stimulating Hormone*) dari kelenjar hipofisa anterior. Oleh karena itu testis mempunyai fungsi sebagai reproduksi dan endokrinologis.

Fungsi reproduksi dari testis adalah menghasilkan sel-sel spermatozoa dari dinding tubulus seminiferus. Sel spermatozoa merupakan hasil akhir dari sel jantan setelah mengalami proses-proses pendewasaan (spermatogenesis).

Fungsi endokrinologi dari testis adalah menghasilkan hormon kelamin jantan yang dihasilkan oleh sel-sel interstitial dari leydig yaitu hormon androgen (Poernomo dkk., 1995).

2.4.1.2. Saluran Kelamin Dengan Kelenjar Kelamin

a. Epididimis

Suatu alat tubuh bentuknya memanjang dan terletak dekat testis merupakan saluran yang berkelok-kelok. Bagian-bagiannya adalah kaput, korpus dan kauda epididimis. Fungsinya adalah transport, penyerapan air, pendewasaan dan penyimpanan sperma. Fungsi dari epitel epididimis adalah untuk absorpsi dan sebagian untuk sekretoris (Poernomo dkk., 1995).

b. Vas deferens atau duktus deferens

Merupakan saluran berdinding otot tebal, sehingga membentuk seperti tali dan jika diraba terasa kenyal. Saluran tersebut menyalurkan sperma dari kauda kedalam uretra (Poernomo dkk., 1995).

c. Uretra

Merupakan saluran eksretoris bersama urine dan semen. Uretra membentang mulai dari daerah pelvis ke penis dan berakhir pada ujung dari glands penis sebagai orificium urethrae eksterna (Poernomo dkk., 1995).

d. Kelenjar-kelenjar assesoris

- Kelenjar vesikula seminalis
- Kelenjar prostata
- Kelenjar cowper (Poernomo dkk., 1995)

2.4.1.2. Pembentukan Sel Kelamin Jantan (Spermatozoa)

Proses pembentukan sperma disebut spermatogenesis, proses ini berlangsung didalam tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis terdiri dari empat tahap (Poernomo dkk., 1995) yaitu :

1. Proliferasi
2. Tumbuh
3. Masak
4. Transformasi (metamorfosa)

Tahap proliferasi terjadi sejak pra lahir sampai beberapa waktu sesudah fetus dilahirkan, setelah itu berhenti. Spermatogenesis baru diteruskan setelah individu menginjak dewasa kelamin. Bakal sel kelamin yang sudah ada pada membrana basal dari tubulus seminiferus melepaskan diri dan setelah mengalami pembelahan secara mitosis menghasilkan sejumlah spermatogonia.

Pada tahap tumbuh, spermatogonium aktif membagi diri secara mitosis sebanyak empat kali. Sebuah spermatogonium akan menghasilkan 16 buah dan tumbuh menjadi spermatosit primer.

Pada tahap menjadi masak dimulai dengan pembelahan meiosis, spermatosit primer berubah menjadi spermatosit sekunder, yang jumlah kromosomnya hanya setengah dari jumlah kromosom dari spermatosit primer. Setelah itu spermatosit sekunder membagi diri secara mitosis menjadi spermatid. Proses dari spermatogonium sampai menjadi spermatid disebut spermatogenesis.

Pada tahap metamorfosa, spermatid berubah menjadi spermatozoa. Proses perubahan dari spermatid menjadi spermatozoa disebut spermiogenesis, ciri-ciri dari proses spermiogenesis adalah :

Aparat golgi menjadi tudung anterior atau akrosom, inti spermatid menjadi kepala sperma, dari sentriol keluar ekor, plasma membran menjadi selubung tubuh sperma, dan mitokondria mengumpul dibagian ekor.

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma (Polakoski and Zaneveld, 1976). Ketika terjadi reaksi akrosom membran plasma lepas dan hilang dari permukaan anterior akrosom. Kejadian ini diikuti dengan pelepasan enzim akrosom sedikit demi sedikit (Flechon and Hafez, 1976).

Ukuran kepala spermatozoa kira-kira panjangnya $4,5\mu\text{m}$ dan diameternya $3\mu\text{m}$. Pada $2/3$ tepi kepala bagian anterior terdapat akrosom (Flechon and Hafez, 1976).

Akrosom mempunyai peranan yang sangat penting, karena mengandung enzim yang essensial untuk proses fertilisasi. Enzim-enzim tersebut antara lain :

- Enzim Hyaluronidase

Enzim ini berfungsi untuk mendispersikan kumulus oophorus dan dengan enzim tersebut memungkinkan spermatozoa menembus lapisan terluar dari ovum (Polakoski and Zaneveld, 1976).

- Enzim Penetrasi Korona (EPK)

Enzim ini berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada korona radiata (Polakoski and Zaneveld, 1976). Dengan adanya enzim tersebut korona radiata hancur (Suhana dkk., 1982). Aktivitas enzim ini dihambat oleh faktor dekapasitasi yang dilepaskan selama perjalanan spermatozoa melalui traktus genital betina (Polakoski and Zaneveld, 1976).

- Enzim Akrosin

Enzim ini berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa melalui zona pellusida. Aktivitasnya dihambat oleh inhibitor dari traktus genital jantan yang melekat pada spermatozoa dan dilepaskan pada saat perjalanan spermatozoa melalui traktus genital betina (Polakoski and Zaneveld, 1976). Spermatozoa yang tidak mengandung akrosin adalah infertil sekalipun motil dan mempunyai membran plasma yang utuh.

- Enzim ATP-ase

Enzim ini mempengaruhi akrosom untuk mengadakan kapasitasi (Polakoski and Zaneveld, 1976).

- Enzim Glukoronidase

Enzim ini dilaporkan berfungsi untuk memecah tetrasakarida yang dihasilkan oleh enzim hyaluronidase dari asam hialoronat (Polaskolki and Zaneveld, 1976).

2.4.1.4. Fungsi Spermatozoa

Pada proses fertilisasi spermatozoa mempunyai beberapa fungsi , yaitu :

2.4.1.4.1. Migrasi

Spermatozoa mulai bergerak didalam epididimis, selama transportasi spermatozoa menggunakan ATP sebagai sumber utama untuk bergerak maupun keperluan biosintesis. Pergerakan atau motilitas spermatozoa bertujuan agar spermatozoa dapat mencapai ovum untuk pembuahan. Spermatozoa harus memiliki motilitas yang baik untuk berpenetrasi sepanjang servical mucus dan bermigrasi sepanjang saluran reproduksi wanita untuk mencapai tempat fertilisasi (Liu and Backer, 1992). Spermatozoa ketika melewati epididimis mengalami maturasi, kemampuan bergerak, serta kapasitas untuk fertilisasi. Pematangan spermatozoa di epididimis meliputi perubahan bentuk, histokimia, fisiologis, biokimia, biofisik dan perubahan metabolik. Pada akhir kapasitas biasanya juga ditandai dengan terjadinya spermatozoa yang hiperaktif yaitu suatu keadaan dimana pergerakan spermatozoa yang cepat dan bersemangat. Hiperaktivasi dari spermatozoa diperlukan untuk melengkapi reaksi kapasitas. Dari studi yang dilakukan, diketahui bahwa spermatozoa yang hiperaktif membantu proses penetrasi pada zona pellusida dan juga membantu efektivitas oviduk dalam transport sperma dan penetrasi pada kumulus oophorus (Salisbury dan N.L. van Demark, 1985).

2.4.1.4.2. Binding

Membran spermatozoa terdiri dari lipida. Dalam hal ini ratio antara membran kolesterol dengan phospholipid pada membran spermatozoa menurun dengan

adanya reaksi kapasitasi dan molekul albumin yang ditemukan atau terdapat pada saluran reproduksi betina mampu mentransfer kolesterol dari spermatozoa. Waktu dari kapasitasi adalah spesifik untuk tiap spesies dan berkorelasi dengan lamanya waktu yang diperlukan untuk merubah ratio kolesterol – phospholipid. Pergeseran kolesterol ini diperlukan untuk mendestabilisasi membran sperma dari reaksi akrosom. Tanpa perubahan ini, fusi dari reaksi akrosom tidak akan terjadi (Liu and Backer, 1992).

2.4.1.4.3. Penetrasi

Pada penetrasi di kumulus oophorus diperlukan fasilitas dengan melepaskan hyaluronidase. Hyaluronidase efektif menghidrolisa kumulus oophorus. Selanjutnya zona pellusida hanya dapat dihidrolisa oleh enzim proteolitik, yaitu akrosin dan tidak dengan hyaluronidase. Spermatozoa mencapai zona pellusida awalnya dengan bagian kepala spermatozoa pada permukaan sel telur, selanjutnya dengan posisi paralel. Selama penetrasi diseluruh zona pellusida dan masuk ke subzona (perivitelline) dalam waktu beberapa menit (Liu and Backer, 1992).

2.4.2. Sistem Reproduksi Hewan Betina

2.4.2.1. Ovarium

Ovarium berfungsi ganda yaitu sebagai alat tubuh yang memproduksi sel kelamin betina yaitu ovum dan hormon-hormon kelamin betina yaitu estrogen dan progesteron. Pada mamalia terdapat dua pasang . Pada sayatan ovarium dapat

dibedakan dua daerah yaitu daerah tepi ovarium disebut korteks dan daerah tengah ovarium disebut medulla. Di daerah korteks ovarium dewasa bisa dilihat berbagai sel telur yang sedang berkembang. Bentuk-bentuk tersebut berupa oogonium yang sedang tumbuh menjadi oosit primer, oosit sekunder, oosit tersier dan ovum. Alat penggantungnya adalah mesovarium (Poernomo dkk., 1996^d).

2.4.2.2. Saluran kelamin dan alat penggantungnya .

2.4.2.2.1. Tuba falopii / oviduk

Terdiri dari infundibulum berikut fimbriae, ampulla dan isthmus. Gerbang infundibulum disebut *ostium tubae abdominalis*. Fimbriae mengandung jaringan erektil dan pembuluh-pembuluh darah melingkar, fimbriae aktif membantu masuknya sel telur yang di ovulasikan ke dalam tuba falopii. Tuba falopii berfungsi sebagai alat dan tempat :

1. Memindahkan sel telur dan sperma ke tempat fertilisasi
2. Pembuahan
3. Kapasitasi sperma
4. Tempat pembelahan zigot

Alat penggantungnya adalah mesosalpinx (Poernomo dkk., 1996^d).

2.4.2.2.2. Rahim / Uterus

Merupakan bagian kaudal tuba falopii terdiri dari sepasang tanduk rahim/kornua, badan rahim/ korpus uteri, dan leher rahim/ serviks uteri. Rahim berfungsi sebagai alat dan tempat untuk transport sperma kedalam tuba falopii, memberi makan

blastosis, pembentukan plasenta, perkembangan embrio/ foetus dan kelahiran anak.

Alat penggantungnya adalah mesometrium (Poernomo dkk., 1996^d).

2.4.2.2.3. Vagina

Vagina merupakan bagian saluran alat kelamin betina yang berfungsi selain sebagai tempat penumpahan semen, juga untuk jalur keluar foetus dan plasenta pada saat partus.

2.5. Fertilisasi

Fertilisasi (pembuahan) adalah peristiwa bersatunya antara spermatozoa dengan sel telur. Pembuahan sering kali diartikan sebagai penyerbukan. Sel spermatozoa atau sel telur berasal dari dua sel yang berbeda, maka untuk dapat bertemu dan bersatu kedua unsur tersebut harus melalui perjalanan panjang dan mengalami proses persiapan serta tempat pertemuan harus memenuhi syarat bagi sel spermatozoa dan sel telur (Partodihardjo, 1982). Menurut Toelihere (1981), pembuahan terjadi dari dua buah sel gamet jantan dan betina untuk membentuk zigot.

Langkah selama proses pembuahan :

1. Kontak awal dengan sel spermatozoa dengan kumulus oophorus segera setelah ovulasi dan adanya polar bodi I didalam ruangan perivitelin serta spindle metaphase dari oosit II.
2. Proses aktivasi dari akrosom, *inner acrosome* membran mengadakan kontak dengan zona pellusida.

3. Sel spermatozoa menuju ruang perivitellin
4. Sel spermatozoa mengadakan penetrasi kedalam ruang perivitellin.
5. Daerah equatorial dari kepala spermatozoa melekat dan mengadakan fusi dengan membran vitellin dan pembelahan meiotic II terjadi.
6. Pronukleus jantan yang besar dan pronukleus betina yang kecil polar bodi II terbentuk
7. Pronukleus migrasi ke pusat oosit
8. Pronukleus bersatu dan berkembang dari metafase sampai telofase dan dimulai fase profase dari pembelahan mitosis I (Hafez,1993).

2.6. Fertilisasi *In Vitro*

Fertilisasi *in vitro* adalah proses fertilisasi buatan yang dilakukan oleh manusia dengan memanfaatkan sel telur dan spermatozoa diluar tubuh. Saat ini fertilisasi *in vitro* telah banyak digunakan dibidang kedokteran umum dan hewan yang dipadukan dengan embrio transfer sebagai salah satu jalan pemecahan untuk mengatasi masalah infertilitas. Dalam usaha pengembangbiakan ternak dengan meningkatkan produktivitas bibit unggul, fertilisasi *in vitro* dipadukan dengan transfer embrio juga merupakan salah satu alternatif. Sehingga dengan teknologi fertilisasi *in vitro* dapat menunjang kesejahteraan manusia (Gardner and Leese, 1993).

Fertilisasi *in vitro* pertama kali berhasil dilakukan pada manusia oleh Steptoe dan Edward tahun 1978 di Inggris (Tomaszewska et al., 1991) yang melahirkan Louis

Brown. Sejak itu ratusan klinik fertilisasi in vitro berdiri diseluruh dunia yang melahirkan lebih dari 20.000 bayi (Gardner and Leese, 1993).

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

1. Sistem memanen sel telur secara efisien dan tidak merusak sel telur.
2. Pematangan inti , sitoplasma dan sel-sel kumulus oophorus dari sel telur.
3. Sistem kultur yang tidak merusak
4. Sistem untuk kapasitasi spermatozoa
5. Sistem dan kondisi yang efisien untuk melakukan fertilisasi.

2.7. Reaksi Akrosom

Reaksi akrosom (RA) merupakan sebuah fenomena yang sangat penting pada proses fertilisasi. Dua komponen yang terjadi dalam RA adalah pecahnya tudung akrosom dan pemanjangan akrosom. RA dapat ditandai dengan adanya pelarutan dari lapisan jelly pada sel telur. Adanya kontak dengan selubung jelly sel telur menyebabkan kerusakan pada tudung akrosom dan pengeluaran enzim-enzim *digesti* protein yang dapat mencerna jalan melalui lapisan jelly menuju permukaan sel telur. Selain itu adanya sulfat polysacharida pada selubung jelly sel telur membawa ion-ion kalsium dan sodium masuk kekepala spermatozoa dan mengganti ion-ion potassium dan hydrogen. Pecahnya tudung akrosom menyebabkan fusi mediasi kalsium pada akrosom membran dengan memendeknya membran plasma spermatozoa (Gilbert, 1988).

Reaksi akrosom dapat pula terjadi karena adanya pengaruh zona pelisida (ZP) tepatnya ZP3 sebagai reseptor spermatozoa pada sel telur. ZP3 ini dapat menyebabkan terjadinya reaksi akrosom karena adanya reaksi silang antara ZP3 dengan antibodi agonis ZP3. Reaksi silang ini menyebabkan terjadinya proses eksositosis, yaitu proses pelepasan enzim akrosom pada spermatozoa (Benhamou *et al*, 1990).

2.8. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Electron Microscopy terdiri dari dua jenis yaitu Scanning Electron Microscopy (SEM) dan Transmission Electron Microscopy ((TEM). Kedua jenis ini mempunyai kelebihan dan kekurangan masing-masing tergantung dari jenis pemeriksaannya. SEM memberikan informasi dengan cepat terhadap seluruh permukaan bahan yang diamati dan gambar yang dihasilkan dalam bentuk tiga dimensi. Sehingga SEM sering digunakan untuk pemeriksaan seluruh organ bukan bagian-bagiannya saja. Sebaliknya pada TEM memberikan informasi tentang bagian-bagian permukaan bahan yang diamati dalam bentuk dua dimensi. Jadi gambar yang dihasilkan terdiri dari potongan-potongan bagian permukaan yang diamati. Sehingga biasanya TEM digunakan untuk memeriksa bagian-bagian tertentu dari organ.

Scanning Electron Microscopy (SEM) atau mikroskop elektron pengulasan adalah sebuah alat khusus yang menggunakan cahaya yang berasal dari elektron dengan energi yang tinggi. SEM menggunakan elektron-elektron yang dihamburkan atau dipancarkan oleh permukaan spesimen untuk dapat menampilkan sebuah

gambar. Spesimen diamati sesudah difiksasi, dikeringkan dan dibungkus dengan selapis tipis logam berat. Spesimen yang kemudian diulas (scanned) dengan seberkas elektron yang dihamburkan atau dipancarkan ketika berkas utama ini mengenai setiap titik berurutan pada permukaan yang berlapis logam diukur dan digunakan untuk mengendalikan intensitas sebuah berkas kedua, yang bergerak selaras dengan berkas utama dan membentuk sebuah gambar pada layar televisi. Dengan cara ini, kita dapat memperoleh sebuah gambar permukaan menyeluruh yang diperbesar (Albert, 1994).

Teknik SEM ini memungkinkan kita memperoleh kedalaman fokus yang luar biasa, selain itu karena banyaknya elektron yang terhambur bergantung pada sudut permukaan terhadap berkas, maka pada gambar terbentuk daerah terang gelap yang menghasilkan kenampakan tiga dimensi. Tetapi hanya daerah-daerah pada permukaan spesimen yang dapat kita amati. Akibatnya teknik ini biasanya digunakan untuk mempelajari sel atau jaringan secara keseluruhan, jadi bukan organel-organel subsele (Albert, 1994).

BAB III
MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan laboratorium hewan percobaan Fakultas Farmasi, serta UPT. Mikroskop Elektron Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian meliputi persiapan dan perlakuan hewan percobaan, koleksi sel telur, koleksi sel sperma, fertilisasi *in vitro* dan pengamatan perubahan morfologi akrosom spermatozoa. Penelitian ini dilakukan mulai Februari 2001 sampai Juni 2001.

3.2. Bahan Dan Materi Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Daun *Gendarussa vulgaris Nees*, mencit jantan umur 4 – 5 bulan dan betina umur 2 – 4 bulan galur Balb C dengan berat badan 20 – 25 g, pakan mencit, aquades, air PAM, medium M₁₆, medium Phosphat Buffer Saline (PBS) (Sigma), Human Chorionic Gonadotropin (hCG)(Intervet), Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) (Intervet), mineral oil (Squibb), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma), serta media untuk scanning elektron mikroskop (SEM).

3.2.2. Alat Penelitian

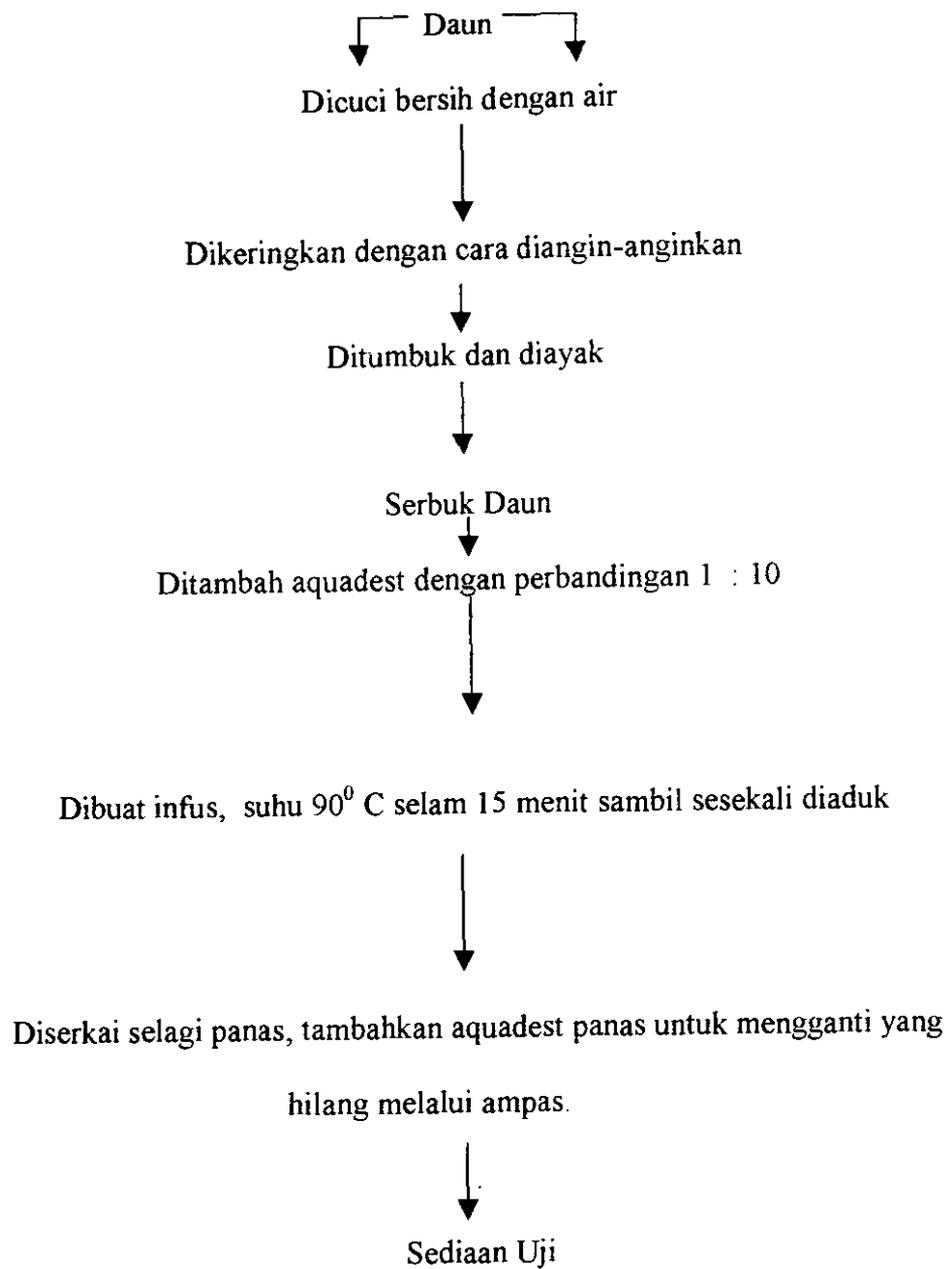
Mikroskop elektron, mikroskop inverted, timbangan analitik, tempat minum, kandang, sonde, gunting bedah, syringe (1cc, 5cc, 10cc)(Terumo), pipet Pasteur(Jerman), petridisk disposable (Nuclon 153066), gunting mikro, pinset mikro, mikropipet otomatis, eppendrof, panci infus, penyaring buchner, cawan porselen, waterbath, dan millipore.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pembuatan Sediaan Uji

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

1. Serbuk daun ditimbang 50 gram, dimasukkan kedalam panci infus kemudian ditambahkan aquadest 500 ml.
2. Dipanaskan dalam panci infus dengan suhu 90° C selama 15 menit dihitung mulai air pada panci mendidih.
3. Disaring selagi panas menggunakan penyaring buchner dan vacum pump. Bila filtrat yang didapat kurang dari 500 ml, ditambahkan aquadest panas melalui ampas sampai diperoleh volume yang diinginkan.
4. Pemberian dosis infus sesuai dengan hasil uji toksisitas akut dan subakut dari infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* (Marliana, 2001).



Gambar 1. Skema Pembuatan Sediaan Uji

3.3.2. Penghitungan Dosis Infus Daun

* Diketahui LD₅₀ infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* adalah :

$$31,37773 \text{ g/Kg Berat Badan mencit (Marliana, 2001)}$$

* Berdasarkan penelitian tentang uji toksisitas akut dan sub akut terhadap infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* dengan dosis $\frac{1}{2}$ LD₅₀, $\frac{1}{4}$ LD₅₀, dan $\frac{1}{6}$ LD₅₀ (Marliana, 2001) diketahui dosis paling efektif adalah $\frac{1}{2}$ LD₅₀ , maka dalam penelitian ini digunakan $\frac{1}{2}$ LD₅₀, yaitu :

$$\begin{aligned} \frac{1}{2}\text{LD}_{50} &= \frac{1}{2} \times 31,37773 \text{ g/Kg BB} \\ &= 15,69 \text{ g/Kg BB} \end{aligned}$$

* Penggunaan dosis pada mencit :

Misalnya mencit dengan berat badan 20 g, maka dosis yang diperlukan adalah :

$$\frac{20 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 15,69 \text{ g} = 313,8 \text{ mg}$$

Pemberian dosis 313,8 mg/20 g BB ditambahkan dengan 0,5 ml aquadest.

3.3.3. Persiapan Hewan Percobaan

Persiapan hewan percobaan diawali dengan melakukan kontrol ulang jenis kelamin dan pemantauan kesehatan secara klinis, kemudian mencit yang menunjukkan kesehatan yang sama dipelihara selama satu minggu agar dapat beradaptasi dengan lingkungan yang baru.

3.3.4. Perlakuan Hewan Percobaan

Mencit jantan dilakukan uji fertilitas dengan cara dikawinkan dengan betina yang sebelumnya dilakukan superovulasi. Mencit jantan fertil adalah yang dapat memberikan kebuntingan pada mencit betina. Hal ini dilakukan pada mencit jantan yang lain sehingga didapat koloni pejantan.

15 ekor mencit jantan yang telah dilakukan uji fertilitas dibagi dalam tiga kelompok perlakuan, yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor untuk uji antifertilitas, yaitu :

Kelompok Kontrol Negatif : 5 ekor mencit diberi aquadest 0,5 ml(pada fertilisasi *in vitro* sel sperma tidak dicampur dengan sel telur).

Kelompok Kontrol Positif : 5 ekor mencit diberi aquadest 0,5 ml (pada fertiisasi *in vitro* sel sperma dicampur dengan sel telur).

Kelompok Perlakuan : 5 ekor mencit diberi infus daun dosis 15,69g/Kg BB.

Dosis diberikan dalam mg/20g BB mencit, berat badan mencit adalah berat badan yang diperoleh dari penimbangan seminggu sekali. Pemberian larutan perlakuan per oral selama 53 hari, setelah itu mencit diambil dari masing-masing kelompok perlakuan tersebut untuk pemeriksaan morfologi akrosom spermatozoa menggunakan scanning elektron mikroskopy.

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 medium M₁₆ sambil dihancurkan dengan menggunakan gunting mikro.

Koleksi sel telur , fertilisasi *in vitro* dan pemeriksaan scanning elektron mikroskop :

1. Melakukan superovulasi dengan menggunakan PMSG dan hCG, yaitu mencit betina disuntik secara intra peritoneal dengan PMSG 5 IU, 48 jam kemudian disuntik dengan hCG 5 IU, dan mencit langsung dikawinkan dengan pejantan kastrasi.
2. 17 jam kemudian dilakukan pemeriksaan sumbat vagina dan langsung dilakukan pembedahan terhadap betina-betina yang positif kawin. Sel telur dikoleksi dari tuba falopii bagian ampula, yaitu dalam kantung fertilisasi.
3. Sel telur yang telah dipanen dicuci berturut-turut dengan medium PBS sebanyak tiga kali, kemudian dicuci dengan medium M16 sebanyak tiga kali, baru dipindahkan ke medium fertilisasi.
4. Sperma dari mencit diambil dari kauda epididimis, kemudian diambil dengan menggunakan pipet yang telah dimodifikasi dibenamkan dalam medium M₁₆ yang telah berisi sel telur.
5. Inkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 3 jam.
6. Diamati terjadinya fertilisasi ataupun tidak

7. Sperma yang menggerombol pada sel telur diambil, dimasukan dalam tabung sentrifuse.
8. Ditambah PBS 100 μ l, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1500 rpm.
9. Endapan diambil kemudian difiksasi
10. Dicuci dengan larutan pencuci, setelah itu dilakukan fiksasi lanjutan.
11. Dehidrasi, kemudian masukan dalam Amyl Asetat.
12. Critical Point Drying (CPD)
13. Coating (melapisi dengan logam)
14. Siap untuk diamati pada mikroskop elektron dengan pembesaran 10.000X
(Prosedur preparasi pada mikoskopi elektron dapat dilihat pada lampiran 2.).

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Skema rancangan penelitian dapat dilihat pada gambar 2.

3.5. Peubah Yang Diamati

Peubah yang diamati adalah perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa yang mengalami fertilisasi ataupun tidak.

3.6. Analisis Data

Data diperoleh berdasarkan adanya perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis Kruskal Wallis dengan derajat kepercayaan 5% (Djarwanto, 1998).

BAB IV
HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian tentang pengaruh pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro* adalah sebagai berikut :

Adanya perubahan normal dan abnormalitas morfologi akrosom pada masing-masing perlakuan yang perbedaannya dihitung menggunakan statistik, yaitu terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$) dengan diketahui H tabel (0,95)(2) sebesar 5,99 sedangkan H hitung sebesar 13,59. (Lampiran 5).

BAB V
PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Perubahan-perubahan yang terjadi pada spermatozoa khususnya pada bentuk morfologinya, dipengaruhi oleh banyak faktor. Faktor-faktor tersebut misalnya saja kondisi lingkungan yang jelek selama proses spermatogenesis hewan jantan, adanya zat-zat bersifat toksik dalam pakan yang dapat berpengaruh terhadap proses spermatogenesis, serta adanya gangguan pada spermatozoa selama perjalannya melalui saluran reproduksi jantan maupun saluran reproduksi betina. Tetapi dalam penelitian ini faktor yang lebih diperhatikan adalah adanya zat-zat yang bersifat toksik selama proses spermatogenesis.

Pada fertilisasi terdapat dua hal penting yang terjadi pada spermatozoa, yaitu proses kapasitasi dan reaksi akrosom. Pada mencit reseptor spermatozoa pada zona pelusida adalah glycoprotein. Spermatozoa melekat pada zona pelusida dengan akrosom yang utuh, dan reaksi akrosom terjadi pada zona pelusida. Sesudah terjadi reaksi akrosom, spermatozoa menjadi lebih aktif dan enzim akrosom dibebaskan untuk melunakan zona pelusida. Setelah penetrasi, terjadi fusi antara spermatozoa dengan ovum dan menyebabkan adanya reaksi kortikal granula yaitu bertujuan mencegah adanya spermatozoa lain masuk atau berpenetrasi dengan zona pelusida dan fusi dengan ovum (Liu and Baker, 1992).

Pada penelitian ini didapat hasil adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan infus daun dengan kelompok perlakuan kontrol positif dan

negatif. Hal ini disebabkan adanya perbedaan pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok.

Kelompok Kontrol Negatif

Diberikan 0,5 ml aquadest, pada fertilisasi *in vitro* sel spermatozoa tidak dicampur dengan sel telur sehingga tidak terjadi fertilisasi. Jadi, sel spermatozoa tidak mengalami proses-proses fertilisasi yang menyebabkan adanya perubahan-perubahan pada akrosom ataupun bentuk pada kepala spermatozoa.

Kelompok Kontrol Positif

Diberikan 0,5 ml aquadest, pada fertilisasi *in vitro* sel spermatozoa dicampur dengan sel telur sehingga memungkinkan terjadinya fertilisasi dengan waktu inkubasi tiga jam. Jadi, adanya pengurangan granula akrosom dan penipisan lapisan akrosom pada kepala spermatozoa menunjukkan gejala awal terjadinya proses fertilisasi.

Kelompok Perlakuan Infus Daun

Pada perlakuan ini diberikan infus daun dengan dosis 15,69 g/Kg BB dan pada fertilisasi *in vitro* sel spermatozoa dicampur dengan sel telur. Dan hasilnya menunjukkan adanya kerusakan pada sebagian besar morfologi spermatozoa. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya zat-zat yang bersifat sitotoksik dalam tanaman *Gendarussa vulgaris Nees* yang dapat mempengaruhi proses spermatogenesis.

Abnormalitas pada spermatozoa mempunyai pengaruh yang sangat besar dalam proses fertilisasi dan juga mempengaruhi daya fertilitas. Salah satu abnormalitas pada spermatozoa adalah tentang morfologi spermatozoa. Penelitian tentang Sperma Penetration Assay (SPA) dalam zona bebas pada oosit hamster

menunjukkan bahwa morfologi spermatozoa yang abnormal mempunyai daya fertilisasi rendah dibanding dengan morfologi spermatozoa yang normal. Hal ini mempunyai korelasi negatif diantara proporsi sperma dengan abnormalitas morfologi dan kesimpulan dari SPA. Liu dan Baker (1992) mengemukakan bahwa zona pelusida mempunyai daya selektivitas yang tinggi untuk melekatnya spermatozoa yang mempunyai morfologi normal. Mayoritas spermatozoa yang melekat pada zona adalah yang mempunyai morfologi normal. Spermatozoa dengan abnormal morfologi mempunyai angka signifikan rendah untuk melekat pada zona dibanding dengan yang mempunyai morfologi normal.

Berdasarkan hasil penelitian diatas , pemberian ekstrak air daun *Gendarussa vulgaris Nees* dengan dosis 15,69g/Kg BB dapat menyebabkan abnormalitas pada morfologi akrosom, hal ini kemungkinan karena adanya pengaruh zat-zat sitotoksik pada kandungan tanaman yang dapat mengganggu atau mempengaruhi reaksi-reaksi metabolisme yang terjadi didalam sitoplasma sel spermatozoa selama proses spermatogenesis.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pemberian infus daun *Gendarussa vulgaris Nees* dengan dosis 15,69 g/Kg BB dapat menimbulkan perubahan abnormalitas pada morfologi akrosom spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.

6.2. Saran

Untuk mengetahui sejauh mana tingkat keabnormalan morfologi akrosom pada penelitian ini, maka dapat disarankan :

- Hasil perubahan morfologi yang dikonfirmasi oleh Scanning Electron Microscopy (SEM) diteruskan dengan menggunakan Transmission Electron Microscopy (TEM) untuk mengetahui perubahan membran akrosom secara lebih jelas.

RINGKASAN

RINGKASAN

Rini Setiyowati. *Gendarussa vulgaris* Nees merupakan salah satu tanaman tradisional yang dapat digunakan sebagai bahan obat kontrasepsi pada pria, karena diketahui bahwa tanaman ini mengandung senyawa yang mempunyai efek antifertilitas (Moeso dan Agus, 1985). Selanjutnya dilakukan penelitian mengenai tanaman ini dalam bentuk infus bagian daunnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap perubahan morfologi akrosom pada spermatozoa mencit (*Mus musculus*) *in vitro*.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 15 ekor mencit jantan galur Balb C berumur 4 – 5 bulan yang telah dilakukan uji fertilitas, kemudian dibagi menjadi tiga kelompok secara acak. Dua kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif dan positif yang masing-masing diberikan aquadest 0,5 ml serta kelompok perlakuan infus dengan dosis 15,69 g/Kg BB selama 53 hari. Setelah itu sperma diambil dari masing-masing kelompok untuk fertilisasi *in vitro*. Setelah tiga jam inkubasi, sperma yang menggerombol disekitar sel telur diambil untuk pemeriksaan morfologi akrosom dengan menggunakan Scanning Electron Microscopy (SEM). Kemudian hasil pemeriksaan dianalisis dengan analisis Kruskal Wallis.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan abnormal pada morfologi akrosom spermatozoa pada kelompok perlakuan infus daun *Gendarussa vulgaris* Nees. Perubahan abnormalitas morfologi akrosom ini kemungkinan dapat

disebabkan oleh adanya zat-zat yang bersifat sitotoksik, yang mempengaruhi reaksi metabolisme spermatozoa selama proses spermatogenesis dari tanaman *Gendarussa vulgaris Nees*.

Berdasarkan penelitian ini disarankan untuk melanjutkan pemeriksaan abnormalitas morfologi akrosom dengan Transmission Electron Microscopy (TEM) untuk mengetahui lebih jelas tentang keadaan membran akrosom.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, B. 1992. Kontrasepsi Dalam Ilmu Kebidanan. Edisi III. Cetakan II. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawiroharjo. Jakarta. p. 905-906.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts dan J.D. Watson. 1994. Biologi Molekuler Sel. Edisi II. P.T. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. p. 227-234.
- Anonimus. 1999. Gendarussa Kalahkan Rematik. Trubus edisi agustus no. 357 tahun XXX. Yayasan Sosial Tani Membangun. p. 51-52.
- Becker, C.A. dan R.B.C. Van den Brink. 1965. Flora of Java. Vol.II. NVP.Noordhof Groningen. Netherland. p. 589-590.
- Benhamou, M., J.S. Gutkind, K.C. Robbins and R.P.Siraganian. 1990. Tyrosin Phosphorylation Coupled to IgE-receptor-mediated signal transduction and histamine release. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87. p. 5327-5330.
- Cholies, N. 1998. Kemungkinan Pengembangan Sumber Bahan Alam Sebagai Obat Kontrasepsi. Seminar sehari obat-obatan Keluarga Berencana. Pada Dies Natalis XXXIV. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 1-3.
- Djarwanto. 1998. Statistik Nonparametrik. Edisi 3. BPFE. Yogyakarta. P.61-65.
- First, N.L. and J.J. Parrish. 1987. *In Vitro* Fertilization of Ruminant. J. Reprod.Fert. 34 : 151-165.
- Flechon, J.E. and E.S.E. Hafez. 1976. Scanning Electron Microscopy of Human Spermatozoa, in : E.S.E. Hafez, Human Semen and Fertility Regulation in Men. Chapter 8. C.V. Mosby company. St. Louis. London. p. 78..
- Gardner, D.K. and H.J. Leese. 1993. Assasement of Embryo Metabolism and Viability in Human Book of *In Vitro* fertilisation. CRC Press. Tokyo. 10 : 196-208.
- Gilbert, S.F. 1998. Development Biology. Edisi II. Sinauer Assosiation Inc. Publisher. Sunderland. Massachusetts. p. 313-330.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animal, Lea and Febiger. Philadelphia.
- Harborne, J.B. 1973. Phytochemical Methods, A Guide to Modern Technique of Plant Analysis : Chapman and Hall. London. pp. 53-80, 357-377.

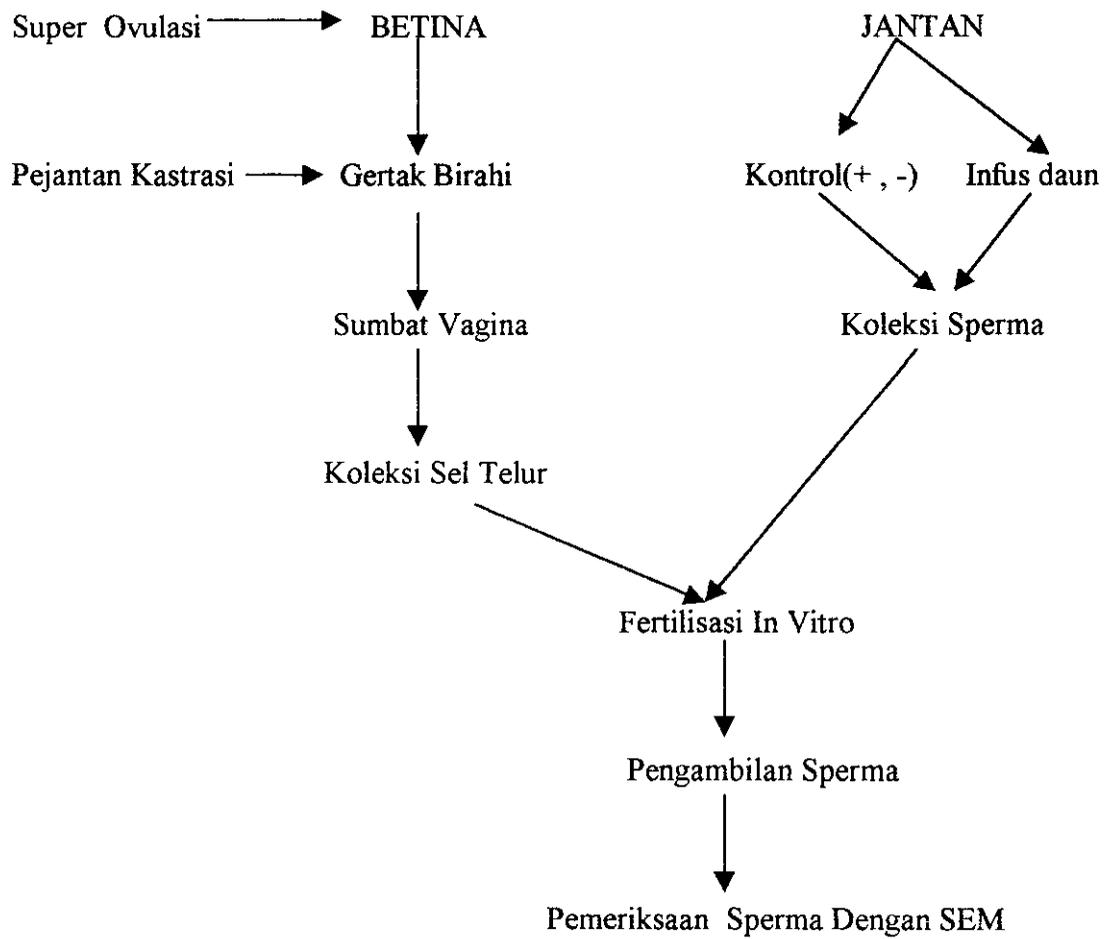
- Harborne, J.B. 1996. Metode Fitokimia. Terbitan Kedua. Institut Teknologi Bandung. Bandung. p. 1-3.
- Hartati, A., Sutarjadi, B.E.W.Prayogo dan P. Onny. 1997. Pengaruh Pemberian Peroral Ekstrak Diklormetan dan Ekstrak Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Spermatozoa Epididimis Mencit. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX. Yogyakarta.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III. Cetakan I. Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Penerbit Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta. p. 1759.
- J. van Steenis, C.G.G., D. den Hoed, S. Bloembergen and P.J. Eima. 1987. Flora of Java. Pradnya Paramitha. Jakarta.
- Kusriningrum, 1989. Dasar Perencanaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 53-92.
- Kusumarini, S.L. 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees Terhadap Aktivitas Enzim Hyaluronidase Spermatozoa Pada Kumulus Oophorus Ovum Manusia *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 8-10.
- Liu and Baker. 1992. Test of Human Sperm Function and Fertilisation in vitro, in : J. of fertility and sterility. 82 (3). p. 472-473.
- Marby, T.J., K.R. Markham and M.B. Thomas. 1970. The Systematic Identification of Flavonoid. Springer Verlag. New York. Heidelberg, Berlin. p. 33-35.
- Markham, K.R. 1988. Cara Identifikasi Flavonoid. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung. p. 27-29.
- Marliana, D.M. 2001. Uji Toksisitas Akut dan Subakut Ekstrak Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap gambaran Hepar dan Ginjal Mencit (*Mus musculus*). Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya. p. 38-39, 62-63.
- Moeso, S. dan P. Agus. 1985. Laporan Perjalanan ke Jayapura Sentani (Irian Jaya). Fakultas Biologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. p. 19.
- 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. p. 1.

- Oeberg, E.F. 1952. Duration Spermatogenesis in Mouse and Timing of The Stage of Cycle of Seminiferus Epithelium, in : The American j. of Anatomy . vol. 19. p. 507-515.
- Padmawati, I.G.A. 2000. Pengaruh Fraksi N-Butanol *Gendarussa vulgaris Nees* terhadap Penurunan Fungsi Penetrasi Spermatozoa pada Mencit dengan Metode Fertilisasi *in vitro*. Skripsi. Fakultas Farmasi . Universitas Airlangga. Surabaya.
- Poernomo, B.S., M. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1995. Diktat Ilmu Mudigah : Pengantar Anatomi, Histologi dan Fisiologi Sistem Reproduksi Jantan . Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 3-21.
- Poernomo, B.S., M. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1996^a. Diktat Ilmu Mudigah : Pengantar Ilmu Mudigah. Fakultas KJedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 49.
- Poernomo, B.S., M. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1996^b. Diktat Ilmu Mudigah : Fertilisasi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabay. p. 15-21.
- Poernomo, B.S., M. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1996^c. Diktat Ilmu Mudigah : Embriogenesis, Implantasi, Perkembangan Selaput Ekstra Embrionik dan Plasenta. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Poernomo, B. S., m. Mafruchati, E.M. Luqman dan Widjiati. 1996^d. Diltat Ilmu Mudigah : Pengantar Anatomi, Histologi dan Fisiologi Reproduksi Betina. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. p. 2-15.
- Polakoski, K.L. and Zaneveld L.J.D. 1976. Biochemistry of Human Spermatozoa. In : E.S.E. Hafez (ed) Human Semen and Fertility Regulation in Men. Chapter 15. c.v. Mosby company. St. Louis. London. p. 78.
- Prayogo, B.E.W., Emmy K., Suhartono, Imam R., Noor Irfansyah dan IGP. Santa. 1994. Bioactivity Study on Decoction and Extrac's of *Justicia gendarussa Burm.f.*. ASOMPS VIII. UNESCO. Melaka. Malaysia.
- Prayogo, B.E.W., Khoiril A., IGP.Santa dan Soeharno. 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormethan dan Metanol daun *Gendarussa vulgaris Nees* terhadap Spermatogenesis Mencit. Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX. Yogyakarta.

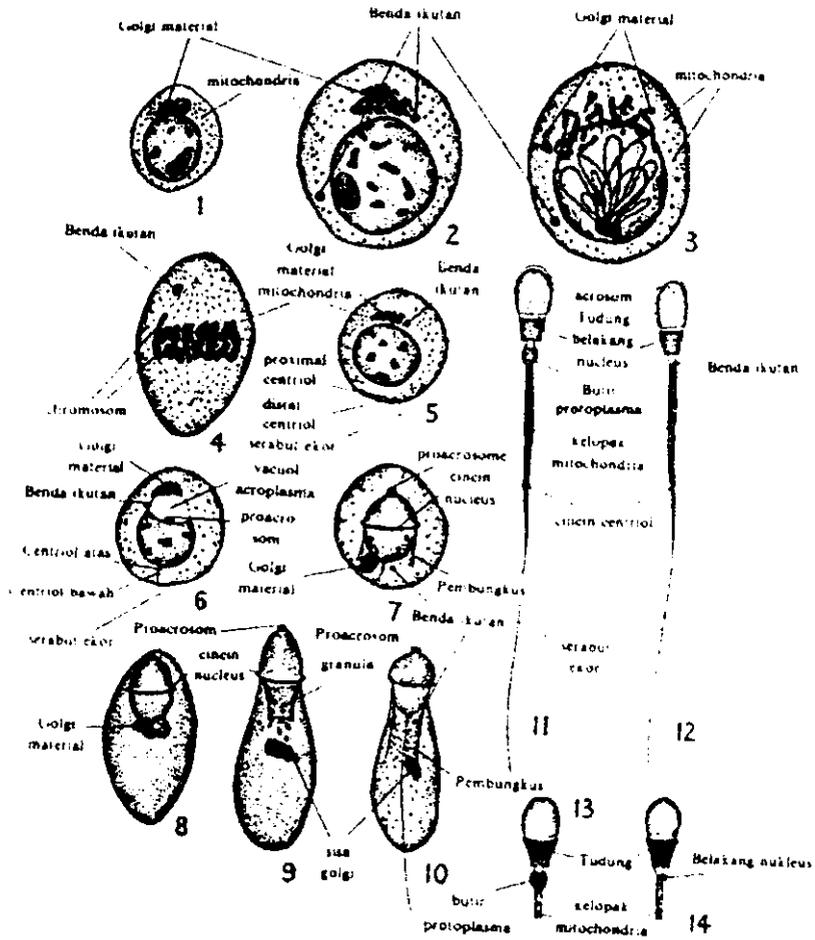
- Salisbury, G.W., dan N.L. van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Diterjemahkan oleh R.Djanuar. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. p. 225-237.
- Shamsuddin, M. And H.R. Martinez. 1994. Developoment of Biological Mamalia. J. Animal Reproduction Science (36). Swedish University of Agricultural Science. Sweden. p. 61-75.
- Siregar, M.N. 1998. Pengaruh Ekstrak Diklormetana dan Metana daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap aktivitas Enzim Akrosin Spermatozoa Kelinci. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya. p. 12.
- Siti, S. 1995. Khasiat Gandarussa sebagai Obat Tradisional. Warta APINMAP Indonesia. Tahun V. vol. V. No. I. p. 8-9.
- Smith, J.B. dan Mangkoewidjoyo S.. 1998. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan Di Daerah Tropis. Universitas Indonesia. p. 10-11.
- Sutarjadi. 1983. Penelitian Pendahuluan Obat Tradisional Penduduk Kalimantan Tengah untuk Pengaturan Kehamilan. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Tarmuzi, K. A. 2000. Pengaruh Hesperitin Terhadap perkembangan Embrio Mencit pada kultur *in vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung.
- Widjiati, E.M. Luqman, E.D. Masithah, M. Mafruchati dan B. Poernomo. 1999. Diktat Ilmu Mudugah : Fertilisasi, Implantasi, Embriogenesis, Morfogenesis, Perkembangan selaput Ekstra Embrionik, Embriogenesis pada katak dan Unggas. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Whittingham, D.G. dan Wood M.J. 1992 Physiologi Reproductive. In : The Mouse in Biomedical Research. Vol. III. Editor Henry L. Foster dkk. Academic Press Inc.. Boston. p. 140.
- Yugo, S. dan Luqman H. 1998. Pengaruh Pemberian Infus Daun Gendarussa (*justicia gendarussa* *Burm.f.*) terhadap Spermatogenesis Tikus putih (*Rattus norvegicus*). Medika. No. 8. Tahun XXIV. p. 505-511.

G A M B A R

RANCANGAN PENELITIAN



Gambar 2. Skema Rancangan Penelitian



Gambar 6. Proses Pembentukan Spermatozoa
(Salisbury dan N.L. Van Demark, 1985)



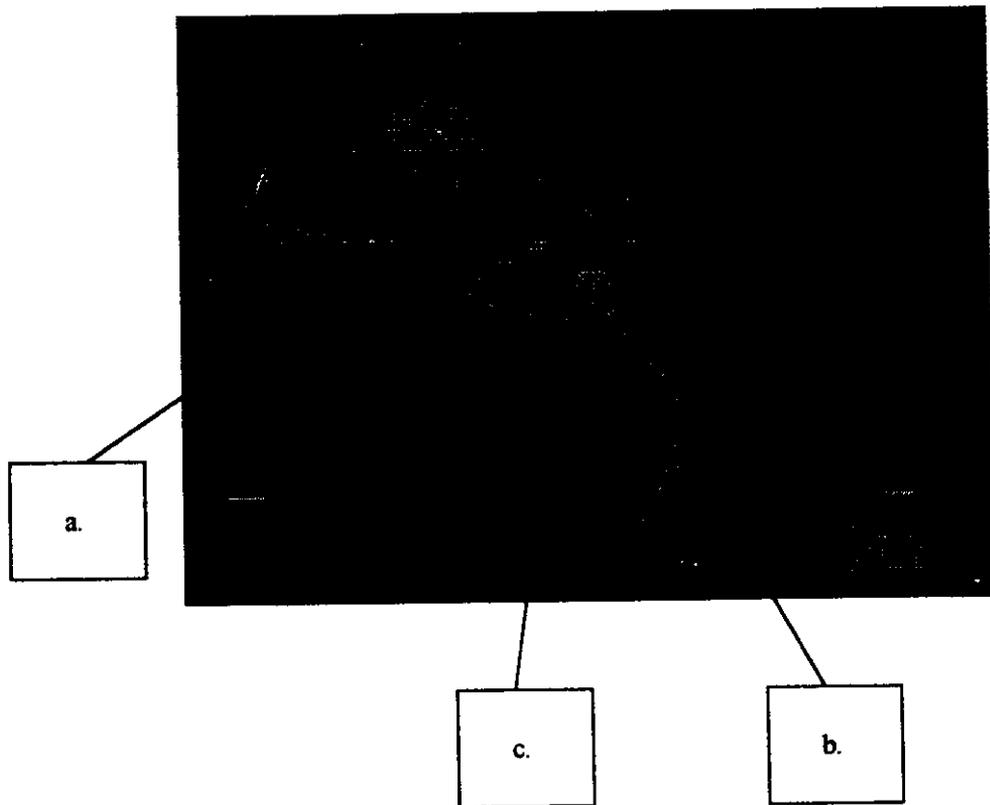
Gambar 7. Scanning Electron Microscopy (SEM)



Gambar 9. Perubahan Akrosom Pada Kontrol Positif

Keterangan :

- a. Nukleus
- b. Membran akrosom
- c. Granula-granula akrosom



Gambar 10. Perubahan Akrosom Pada Kontrol Negatif

Keterangan :

- a. Nukleus utuh
- b. Granula-granula akrosom
- c. Membran akrosom

LAMPIRAN

Lampiran 1. **Medium M16**

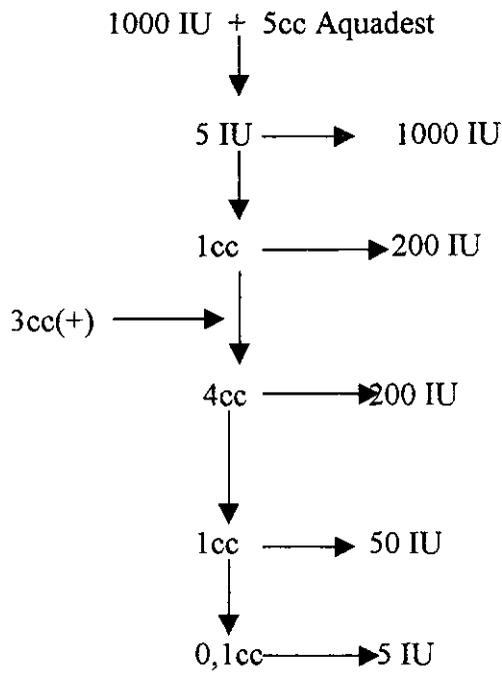
	μ l	Gram/liter
1. NaCl		5,333
2. KCl		0,356
3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,252
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,293
5. NaHCO_3		2,101
6. Na Laktat 60%	2840	
7. Na Piruvat		0,036
8. KH_2PO_4		0,162
9. Glukosa		1,000
10. Bovine Serum Albumin		4,000
11. Penicilin		0,060
12. Sterptomycin		0,050
13. Aquabidest		1 lt
14. Fenol Red		

Lampiran 2. Medium Phosphat Buffer Saline (PBS)

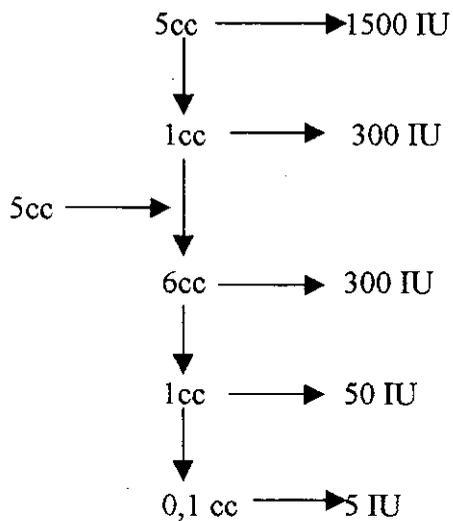
	Gram/200ml
1. PBS Powder	1.92
2. Glukosa	0,20
3. Na Piruvat	0,0072
4. Penicilin	0,012
5. Streptomisin	0,010
6. Bovine Serum Albumin	3,0 %

Lampiran 3. Penghitungan Dosis Super Ovulasi

PMSG (Foligon) → 1000 IU



hCG (Chorulon) → 1500 IU



Lampiran 4. PREPARASI ELECTRON MICROSCOPY**TAHAP-TAHAP :****1. FIKSASI**

Ada 2 : - Perfusi : Perfusi khusus

Perfusi total

- Imersi

Persiapan Alat :

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| - Dissecting bed | - Standard |
| - Stoples | - Exicator |
| - Gelas ukur 100cc | - Stopples |
| - Vervan | - Injectie spuit 1cc |
| - Meja secting | - Kertas manila |
| - Ligature (tali) | - Jarum kanul (plastik) |
| - Hand scone | - Jarum biasa |

Persiapan Reagensia :

- Wash buffer
- Larutan Fiksasi
- Diethyl eter
- Larutan Pentobarbital 6%
- Hewan percobaan / Sampel

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

Cara Pembuatan Reagensia :

@ Sebelum kita buat larutan pencuci maupun larutan fiksasi, terlebih dahulu kita buat Buffer Fosfat Stock.

@ Caranya :

Menimbang stock I Solution 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$acid salt 37,6 g/l

Menimbang Stock II Solution 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$basa salt 35,6 g/l

Larutan dalam becker glass atau erlenmeyer 35.6 gram + aqua add 500cc (aquabidestilata).

Ambil erlenmeyer lain 27,6 g/l + aquabidest add 500 cc kemudian larutkan sama sekali, setelah larut diukur dengan PH meter.

Masukan elektroda kedalam Stock II Solution [0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] basa.

Kemudian sedikit demi sedikit stock I solution [0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$] asam, masukan kedalam stock II solution sambil digoyang-goyang sampai tercapai pH 7,4. Setelah tercapai pH 7,4(pH 7,38) + aquabides add 1000 cc. Maka kita dapatkan 0,2 M Buffer fosfat stock pH 7,4.

Diberi label pada erlenmeyer (nama larutan, nama yang membuat, tanggal pembuatan). Larutan tahan satu sampai dua minggu.

Cara membuat buffer cuci untuk perfusi :

- 500 cc 0,2 M buffer fosfat pH 7,4 + 2% PVP (Poly Vinyl Pirlidon)
- Menimbang 20 gram PVP
- Menimbang 4 gram NaNO_2 , kedua bahan masukkan erlenmeyer 1000 cc yang telah berisi 500 cc 0,2M buffer fosfat pH 7,4

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

- Larutkan hingga larut sama sekali
- Setelah larut ditambah aquabidest add 1000 cc, maka kita dapatkan 0,1 M buffer fosfat + 2% PVP + 0,4% NaNO₂.
- Kemudian diberi label

Cara Membuat Larutan Fiksasi Untuk Perfusi :

- Kita buat larutan 2% dari stock solution 25% Glutaraldehyde

$$X \times 25 \% = 1000\text{cc} \times 2\%$$

$$25X = 2000\text{cc}$$

$$X = 2000/25$$

$$= 80 \text{ cc}$$

- Ambil dari botol 80 cc glutaraldehyde 25 % masukan erlenmeyer atau botol bersih dan masukkan 500 cc),2 M Buffer fosfat.
- Erlenmeyer diisi dengan aquabidest sampai 1000 cc.
- Konsentrasi akhir = 0,1 M buffer fosfat dengan 2% Glutaraldehyde
- Diberi label

Cara kerja Perfusi :

A. Perfusi Khusus (Kidney)

1. Alat-alat disiapkan semua
2. Siapkan larutan fiksasi dan wash buffer
3. sampel dimasukkan wash buffer satu menit
4. Sampel dimasukkan larutan fiksasi selama lima menit

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

B. Perfusi Total

Perfusi total ialah perfusi ginjal, hati, dll. [seluruh organ], prinsip lebih mudah tetapi hasilnya tidak 100%.

2. LARUTAN PENCUCI

Larutan pencuci adalah 0,1 M buffer fosfat dengan 6,8 % Suchrose.

Persiapan alat :

- Erlenmeyer 1000 cc
- Gelas ukur
- Balance

Persiapan Reagensia :

- Buffer fosfat stock pH 7,4
- Sacharose
- Aquabidest

Cara kerja :

- Ambil 500 cc dari 0,2 M buffer solution pH 7,4
- Timbang 0,8 gram sacharose dan masukkan dalam erlenmeyer lalu dilarutkan.
- Baru ditambah sampai 1000 cc dengan aquabidest.
- Konsentrasi terakhir pasti 0,1 buffer fosfat cuci.
- Beri label

Cara Pelaksanaan :

- Sampel yang berada dalam larutan fiksasi diambil

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

- Larutan fiksasi dibuang, diganti dengan larutan pencuci I, 3 x lima menit dalam temperatur kamar.

3. FIKSASI LANJUTAN

Post fiksasi disini digunakan 1% Osmium (OSO_4) dalam 0,1 M buffer fosfat.

Caranya : Kita buat larutan Osmium stock 2% :

- Membuat ampul bersih dengan aqua bidest atau chromic acid sebab bila ampul ada minyak, terjadi kontamiinasi, karena Osmium justru memfiksir lemak, sehingga warnanya akan hitam dan tidak bisa dipakai lagi.
- Botol coklat yang dpakai untuk osmic acid harus dibersihkan dengan chromic acid. Chromic acid gelap dibersihkan terus dibuang dengan air kran dan tiga kali dengan aquabidest.
- Ampul tidak boleh dipegang dengan kertas biasa tetapi dengan kertas filter atau hand scone didalam ruang asam, digergaji tidak sampai patah kemudian dipatahkan dan dimasukkan dalam botol larutan stock 2%.
- 2 gram dimasukkan 100 cc aquabidest, karena satu ampul Osmium isinya 1 gram maka diisi aquabidest 50 cc.

2 gram.....100 cc

1 gram50 cc

Cara membuat :

- Kita ambil 5 cc 2% OSO_4 masukan dalam gelas ukur 10 cc.
- Kemudian tambahkan 5 cc 0,2 M buffer fosfat stock kedalamnya

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

- Masukkan botol coklat, kemudian tutup botolnya dan tutup lagi dengan parafin, beri label.

Cara pelaksanaan :

- Sampel yang telah dicuci tiga kali dengan buffer stock dalam 6.8 % suchrose
- Setelah pencucian terakhir dibuang, diganti dengan larutan 1% OSO_4 dalam 0,1 M buffer selama 2 jam 4°C tidak terlalu lama.

4. LARUTAN PENCUCI II

Digunakan 0,1 M buffer fosfate dalam aquabidest.

Cara membuat :

- Kita ambil 50 cc 0,2 buffer fosfat stock masukkan gelas ukur
- Tambah aquabidest sampai 100 cc, masukan botol dan beri label

Cara kerja :

- Setelah post fiksasi dua jam, kemudian larutan OSO_4 dibuang dalam tempatnya.
- Dicuci dengan 0,1 buffer fosfat tiga kali 5menit pada temperatur kamar.

5. DEHIDRASI

Menggunakan larutan Etanol 100% sebagai stock solution.

Alat-alat :

- Erlenmeyer bertutup
- Cawan porselen
- Kaki tiga

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

- Kasa kawat
- Bunzen (Gas)
- Exicator dengan silika gel
- Pinset Botol bertutup empat buah
- Gelas ukur

Reagensia :

- $MgSO_4$ padat
- Ethanol 100%
- Aquabidest

Cara kerja :

- $MgSO_4$ padat dipanaskan didalam ruang asam sampai merah
- Setelah itu diangkat dimasukkan exicator selama setengah jam.
- Kemudian ethanol 96% diisi dengan $MgSO_4$ padat tadi sampai terlihat ada endapan.
- Maka H_2O yang ada dalam ethanol 96% akan diikat oleh $MgSO_4$
- Maka didapat ethanol absolut, diberi label.

Cara membuat Alkohol bertingkat :

- Alkohol 30%
- Ambil 30 cc absolut Ethanol tambah aquabidset sampai 100 cc
- Demikian juga untuk 50% dan 70%
- Kemudian diberi label masukkan botol

Lampiran 4. Preparasi Electron Microscopy

Cara kerja :

- Setelah sampel dicuci buffer tiga kali 5 menit kemudian yang terakhir dibuang.
 - Dehidrasi alkohol 30% - 50% - 70% masing-masing 10 menit pada temperatur ruangan (rotasi).
 - Pada alkohol 70% bisa semalam
 - Dhidrasi alkohol 100% dua kali masing-masing 60 menit, pada pada temperatur ruangan.
6. Masukkan Amyl Asetat
 7. CPD (Critical Point Drying)
 8. COATING (melapisi dengan logam)
 9. Siap diperiksa dengan Mikroskop Elektron.

Lampiran 5. Analisis Kruskal Wallis Pengaruh Pemberian Infus Daun *Gendarussa vulgaris Nees* Terhadap morfologi Akrosom Pada Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) *In Vitro*.

Ulangan	Perlakuan						M
	Kontrol Negatif		Kontrol Positif		Infus Daun		
	Di	Ri ¹	Di	Ri ¹	Di	Ri ¹	
1.	+	3	++	8	+++	12	1210
2.	+	3	++	8	++++	14,5	
3.	+	3	++	8	+++	12	
4.	+	3	++	8	+++	12	
5.	+	3	++	8	++++	14,5	
$\sum Ri^1$		15		40		65	
$\sum Ri^1/ni$		3		8		13	
$(\sum Ri^1)^2$		225		1600		4225	
$(\sum Ri^1)^2/ni$		45		320		845	

Keterangan :

- + : - Granula-granula akrosom terlihat jelas
- Tudung akrosom tampak jelas
- Bentuk kepala spermatozoa normal
- ++ : - Granula-granula akrosom sedikit
- Lapisan akrosom pada kepala spermatozoa tampak menipis
- +++ : - Pelepasan tudung akrosom
- Granula-granula akrosom tampak sedikit
- Keretakan bagian nukleus kepala spermatozoa
- ++++ : - Pelepasan tudung akrosom
- Granula-granula akrosom tampak sedikit
- Keretakan bagian nukleus kepala spermatozoa
- Bentuk kepala spermatozoa lebih lonjong atau kerucut

Di = Data

Ri = Rank

Ri¹ = Rataan rank untuk data yang sama

ni = Banyaknya ulangan

N = $\sum ni$ = jumlah total data

M = $\sum [(\sum Ri^1)^2 / ni]$

Menentukan R_i^1 **Rata-rata rank untuk skor +**

$$\frac{1 + 2 + 3 + 4 + 5}{5} = \frac{15}{5} = 3$$

Rata-rata rank untuk skor ++

$$\frac{6 + 7 + 8 + 9 + 10}{5} = \frac{40}{5} = 8$$

Rata-rata rank untuk skor +++

$$\frac{11 + 12 + 13}{3} = \frac{36}{3} = 12$$

Rata-rata rank untuk skor ++++

$$\frac{14 + 15}{2} = \frac{29}{2} = 14,5$$

$$\begin{aligned} H \text{ hitung} &= \frac{12}{N(N+1)} \sum \frac{R_i^1{}^2}{n_i} - 3(N+1) \\ &= \frac{12}{15(16)} \times (1210) - 3(16) \\ &= \frac{14520}{240} - 48 \\ &= 60,5 - 48 \\ &= 12,5 \end{aligned}$$

Karena terdapat data yang kembar maka dimasukkan faktor koreksi, sehingga :

$$H \text{ hitung terkoreksi} = \frac{H \text{ hitung}}{1 - [\sum T / (N^3 - N)]}$$

Keterangan $T = t^3 - t$

T = banyaknya data yang sama

$$\begin{aligned}
 T+ &= 5^3 - 5 = 125 - 5 = 120 \\
 T++ &= 5^3 - 5 = 125 - 5 = 120 \\
 T+++ &= 3^3 - 3 = 27 - 3 = 24 \\
 T++++ &= 2^3 - 2 = 8 - 2 = 6 \\
 \Sigma T &= T+ + T++ + T+++ + T++++ = 120 + 120 + 24 + 6 = 270 \\
 N &= 15 \\
 N^3 - N &= 15^3 - 5 = 3375 - 5 = 3360
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 H \text{ hitung terkoreksi} &= \frac{12,5}{1 (270/3360)} \\
 &= \frac{12,5}{12,5} \\
 &= \frac{1 \ 0,08}{12,5} \\
 &= \frac{0,92}{12,5} \\
 &= 13,59
 \end{aligned}$$

Diketahui $H_{tabel} (0,95)(2)$ sebesar 5,99 sedangkan H hitung sebesar 13,59 maka dapat dinyatakan ada perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).