

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN PERORAL EKSTRAK DAGING BUAH
MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP PERSENTASE
KAPASITASI DAN REAKSI AKROSOM PADA TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**



Oleh :

DHANANG ESTU BAGYO
NIM. 061211133082

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA
(Phaleria macrocarpa) TERHADAP PERSENTASE KAPASITASI DAN REAKSI
AKROSOM SPERMATOZOA PADA TIKUS PUTIH
(Rattus norvegicus)**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

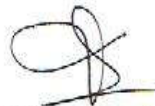
Oleh

DHANANG ESTU BAGYO

NIM 061211133082

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



(Dr. Budi Utomo, drh., M.Si.)
Pembimbing Utama



(Rudy Sukanto Setiabudi, drh., M.Sc.)
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

PENGARUH PEMBERIAN PERORAL EKSTRAK DAGING BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP PERSENTASE KAPASITASI DAN REAKSI AKROSOM SPERMATOZOA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Juli 2016



Dhanang Estu Bagyo
061211133082

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal: 28 Juli 2016

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Prof. Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Sekretaris : Dr. Tutik Juniastutik, drh., M.Kes.

Anggota : Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si

Pembimbing Utama : Dr. Budi Utomo, drh., M.Si

Pembimbing Serta : Rudy Sukamto S, drh., M.Sc

Telah diuji pada

Tanggal: 12 Agustus 2016

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Anggota : Dr. Tutik Juniastutik, drh., M.Kes.

: Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si

: Dr. Budi Utomo, drh., M.Si

: Rudy Sukamto S, drh., M.Sc

Surabaya, 15 Agustus 2016

Fakultas Kedokteran Hewan,

Universitas Airlangga,

Surabaya,

Dekan



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.

NIP. 195601051986011001

THE EFFECT OF EXTRACT OF MAHKOTA DEWA PULP (*Phaleria macrocarpa*) PERORAL TOWARD THE PERCENTAGE OF CAPACITATION AND ACROSOME REACTION IN WHITE RAT (*Rattus norvegicus*)

Dhanang Estu Bagyo

ABSTRACT

This research was conducted to found out the influence of the pulp of mahkota dewa's extract (*Phaleria macrocarpa*) against the percentage of capacitation and acrosome reaction of male white rat (*Rattus norvegicus*). The experimental animals used are 20 male white rats with average weight 200 g were divided into four groups. P0 as control given a solution of CMC Na 0.5% without the mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). P1, P2 and P3 were given extracts of pulp of the mahkota dewa with successive doses of plundering of 7.5 mg/200 grBB 15 mg/200 grBB and 30 mg/200 grBB respectively and given peroral 1 ml/head/day for 14 days. The research used Completely Randomized Design and analyzed by ANOVA (Analisis of Variance) then continued use duncan test with a significance 0.05. The results showed that the extract fruit the mahkota dewa gave significant impacted on capacitation and acrsome reaction white rat. P2 showed the highest mean with $30,00 \pm 4,24$ for capacitation and $5,60 \pm 0,89$ for acrosome reaction.

Key Words: Reactive Oxygent Species (ROS), acrosome reaction, capacitation, mahkota dewa

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Pengaruh Pemberian Peroral Ekstrak Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Persentase Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).**

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes. atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dr. Budi Utomo, drh., M.Si selaku pembimbing pertama dan Rudy Sukanto S., drh., M.Sc. selaku pembimbing serta terima kasih atas doa, saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes. selaku ketua penguji, Dr. Tutik Juniastuti, drh., M.Kes. selaku sekretaris penguji dan Dr. Tjuk Imam Restiadi, drh., M.Si. selaku anggota penguji terima kasih atas saran dalam penyempurnaan skripsi ini.

Prof. Dr. Imam Mustofa, drh., M.Kes. selaku dosen wali terima kasih atas doa, bimbingan, dukungan dan nasihat yang membangun selama ini dan seluruh staff pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan, bimbingan dan motivasi selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak, ibu tercinta, Amano dan Indun Juwariah serta kakak saya Indah Agustina, dan tidak lupa segenap keluarga besar terima kasih telah memberikan doa, nasihat, motivasi dan dukungan baik material maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini.

Sahabat penelitian Amaq Fadholly terima kasih atas kerjasama dan kesabarannya dalam menyelesaikan penelitian ini. Sahabat – sahabat saya M. Nahil F., Arja Gita K., Dinar Agustina, Agustin P. S. I. M., Ana Adelina, Febrina Ayu P., Doohan Mahendra terimakasih atas segala doa, dukungan dan kebersamaannya. Terimakasih kepada sahabat angkatan Phoenix Bady septian, Rizal zahri, edward EYK, Yanuansa, Yana, Yusdi, Naufal, Baskoro, Candra, Lie Fian, Alboys, Nafi, Agung, Subagio, Aria Rasyid, Aghid dan tidak lupa seluruh teman – teman Kelas D yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu terimakasih banyak atas segala doa, dukungan dan bantuan yang telas diberikan dalam membantu penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan skripsi ini. Semoga hasil yang dituangkan dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca sekalian.

Surabaya, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	vi
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Landasan Teori	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
1.6 Hipotesis Penelitian.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)	8
2.1.1 Klasifikasi.....	8
2.1.2 Morfologi.....	8
2.1.3 Kandungan kimia dan manfaat.....	10
2.1.4 Sinonim dan nama lain mahkota dewa.....	11
2.2 Tikus (<i>Rattus novogicus</i>).....	11
2.2.1 Klasifikasi tikus putih	12
2.2.2 Karakteristik reproduksi tikus putih	15
2.2.3 Testis tikus putih	16
2.2.4 Penis tikus putih.....	17
2.2.5 Epididimis tikus putih.....	17
2.2.6 Kelenjar assesoris tikus putih.....	18
2.3 Semen	18
2.3.1 Spermatozoa	19
2.3.2 Plasma semen	21
2.4 Kapasitas	22
2.5 Reaksi Akrosom	23
2.6 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) ..	27

2.6.1	Pengertian ROS	27
2.6.2	Sumber pembentukan ROS	28
2.6.3	Stress oksidatif	30
2.6.4	Antioksidan sebagai penawar	31
BAB 3	MATERI DAN METODE	33
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian	33
3.2	Bahan dan Materi Penelitian	33
3.2.1	Hewan percobaan	33
3.2.2	Bahan penelitian	33
3.2.3	Peralatan penelitian	34
3.3	Metode Penelitian	34
3.3.1	Pembuatan ekstrak buah mahkota dewa	34
3.3.2	Perlakuan terhadap hewan coba	35
3.3.3	Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis	36
3.3.4	Pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom	36
3.3.5	Definisi operasional	37
3.4	Variable Penelitian	37
3.5	Rancangan Penelitian	38
3.6	Analisis Data	38
3.7	Alur Pelaksanaan Penelitian	39
BAB 4	HASIL PENELITIAN	40
4.1	Pemeriksaan Awal Spermatozoa	40
4.2	Persentase Kapasitas Spermatozoa	41
4.3	Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa	43
BAB 5	PEMBAHASAN	46
5.1	Persentase Kapasitas Spermatozoa	46
5.2	Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa	49
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	52
6.1	Kesimpulan	52
6.2	Saran	52
	RINGKASAN	53
	DAFTAR PUSTAKA	55
	LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Hasil pemeriksaan semen tikus putih makroskopis.....	40
4.2. Hasil pemeriksaan semen tikus putih mikroskopis.....	40
4.3. Hasil pemeriksaan kapasitas spermatozoa.....	41
4.4. Hasil pemeriksaan reaksi akrosom spermatozoa.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Buah mahkota dewa	9
2.2. Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.3. Spermatozoa tikus putih	20
2.4. Spermatozoa domba pewarnaan FITC.....	24
3.1. Kerangka operasional penelitian.....	39
4.1. Spermatozoa tikus putih dengan pewarnaan FITC	42
4.2. Diagram batang hasil ipersebtase kapasitas spermatozoa tikus putih .	43
4.3. Spermatozoa tikus putih dengan pewarnaan FITC	45
4.4. Diagram batang hasil reaksi akrosom spermatozoa tikus putih.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Penghitungan dosis ekstrak daging buah mahkota dewa.....	64
2. Prosedur penampungan semen tikus.....	65
3. Prosedur pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom.....	66
4. Dokumentasi penelitian.....	67
5. Hasil analisis statistik kapasitas.....	69
6. Hasil analisis statistik reaksi akrosom.....	72

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Ca ²⁺	= <i>Ion Calcium</i>
CPE	= <i>Corona Penetrating Enzyme</i>
FITC	= <i>Fluorescent Isotiocianat</i>
DAG	= <i>Diacylglycerol</i>
DNA	= <i>Deoxyribose-Nucleic Acid</i>
FSH	= <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
g	= gram
GnRH	= <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
ICSH	= <i>Intertitital Cell Stimulating Hormone</i>
IP3	= <i>Inositol Triphosphate</i>
IP4	= <i>Inositol Tetrphosphate</i>
K ⁺	= <i>Ion Kalium</i>
LH	= <i>Luteinizing Hormone</i>
Mol	= Jumlah Zat
NADPH	= <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotida Phoaphate Hydrogen</i>
Na ⁺	= <i>Ion Natrium</i>
PIP	= <i>Phosphatidrilinositol Diphosphate</i>
PUFA	= <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	= <i>Reactive Oxygen Species</i>
%	= Persentase
°F	= Derajad Fahrenheit

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Subsektor peternakan mempunyai peranan penting dalam perekonomian Indonesia serta berperan sangat penting dalam mendukung ketahanan pangan nasional terutama sebagai penyedia pangan hewani. Seiring dengan pertumbuhan penduduk dan pertumbuhan ekonomi tingkat konsumsi serta kebutuhan akan daging sapi masyarakat Indonesia mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Perkembangan tingkat konsumsi daging sapi per kapita masyarakat Indonesia dari tahun 1993 hingga 2014 berfluktuasi dan cenderung naik. Pada tahun 1993 tingkat konsumsi daging sapi masyarakat Indonesia sebesar 0,704 kg/kapita/tahun naik menjadi 2,36 kg/kapita/tahun pada tahun 2014 (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2015)

Namun sejauh ini Indonesia belum mampu menyuplai semua kebutuhan tersebut. Untuk memenuhinya diperlukan peningkatan populasi sapi dalam jumlah besar. Oleh karena itu pemulihan kinerja sektor industri pangan asal ternak sudah saatnya diprioritaskan pada optimalisasi dan pemberdayaan sumber daya lokal melalui pengembangan inovasi teknologi yang tepat. Untuk dapat mengetahui dan memahami ketersediaan serta perkembangan teknologi untuk mendorong usaha peternakan sapi potong, perlu dilihat perkembangan bioteknologi peternakan. Cakupan bioteknologi peternakan salah satunya adalah IVF (*In Vitro Fertilization*) (Cunningham, 1999 dikutip dari Diwyanto, 2008).

Keberhasilan IVF salah satunya dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa (Morrell, 2006 dikutip dari Sujoko dkk., 2009). Kualitas spermatozoa penting dalam membantu spermatozoa menembus sel – sel pelindung yang melindungi sel telur (Herdis dkk., 2005). *In Vitro Fertilization* (IVF) merupakan teknologi reproduksi embrio pada media di luar tubuh (Jaswandi dkk., 2001dikutip dari Sujoko dkk., 2009). Sedangkan menurut Sukra dkk. (1992) dikutip dari Dasrul dkk. (2012) *In Vitro Fertilization* dapat diartikan suatu teknik pembuahan yang terjadi di luar tubuh induk dengan cara mempertemukan sel telur yang matang dengan sel spermatozoa yang telah berkapasitasi dalam cawan yang berisi medium kultur.

Secara umum dalam fertilisasi melibatkan 2 proses yang penting yaitu kapasitasi dan reaksi akrosom (Asmarinah, 2010). Kedua proses tersebut saling berkelanjutan. Tanpa proses kapasitasi, spermatozoa tidak mampu untuk melakukan fertilisasi (Bearden and Fuquay, 2000). Salah satu pembatas utama dalam aplikasi teknologi fertilisasi *in vitro* adalah kapasitasi spermatozoa *in vitro* (Kanagawa *et al.*, 1989 dikutip dari Wattimena, 2006). Kapasitasi dimaksudkan untuk menghilangkan faktor dekapasitasi (melindungi stabilitas membran plasma spermatozoa) yang terkandung didalam plasma semen sehingga kapasitasi dan reaksi akrosom dapat terjadi (Wattimena, 2006).

Spermatozoa membutuhkan senyawa spesies oksigen reaktif atau *Reactive Species Oxygent* (ROS) pada konsentrasi rendah untuk menginduksi proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Sikka, 2004). Bila produksi radikal bebas meningkat atau produk antioksidan rendah akan menimbulkan stres oksidatif

(Widayati, 2011). Stres oksidatif diduga merupakan salah satu penyebab infertilitas dengan memberikan pengaruh negatif terhadap kualitas spermatozoa seperti peningkatan kehilangan motilitas, kerusakan membran, penurunan morfologi normal, viabilitas dan kemampuan kapasitas spermatozoa. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan ROS membentuk ikatan kovalen dengan komponen biomolekul di dalam sel. Jika hal ini terjadi maka akan terjadi keruntuhan struktur biomolekul penyusun sel yang berakibat kerusakan dan hilangnya fungsi sel spermatozoa (Panghiyangan, 2001; Dahlan dan Tjokronegoro, 2002. Dikutip dari Panghiyangan dkk., 2009). Untuk menghindari hal tersebut dibutuhkan antioksidan tambahan dari luar atau antioksidan eksogen seperti vitamin E, vitamin C, maupun berbagai jenis sayuran dan buahan. Peranan antioksidan sangat penting dalam menetralkan dan menghancurkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga dapat merusak biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein didalam tubuh (Silalahi, 2002. Dikutip dari Soeksmanto,2007).

Bahan herbal yang berpotensi sebagai antioksidan eksogen salah satunya adalah buah mahkota dewa yang banyak tumbuh di Indonesia. Senyawa antioksidan yang terdapat dalam kulit dan daging buah mahkota dewa adalah flavonoid dan senyawa polifenol. Senyawa fenolik dikatakan memiliki aktivitas antioksidan, memungkinkan untuk menangkap dengan baik ROS maupun elektrofil, menghambat nitrisasi dan memiliki potensi untuk autooksidasi serta kemampuan untuk memodulasi aktivitas enzim seluler tertentu. Oleh karena itu,

mahkota dewa dapat dimanfaatkan sebagai bahan antioksidan untuk mengurangi efek yang ditimbulkan oleh senyawa radikal bebas (Guselli *et al.*, 1998).

Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian ini hendak dilakukan pengujian terhadap pengaruh pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) peroral terhadap persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa yang menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka dapat dirumuskan permasalahannya adalah Apakah pemberian peroral ekstrak daging buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat meningkatkan persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3. Landasan Teori

Kapasitasi dan reaksi akrosom merupakan dua fenomena yang terpisah, kapasitasi adalah serentetan perubahan yang membuat spermatozoa mengalami reaksi akrosom, reaksi akrosom bertujuan untuk membantu menembus zona dan meleburkannya dengan selaput plasma sel telur (Yanagimachi, 1994).

Kapasitasi merupakan proses yang penting karena dapat meningkatkan motilitas, mengantarkan sperma ke *cumulus ooporus*, dan mempersiapkan sperma menjalani reaksi akrosom. Aspek – aspek yang perlu diperhatikan dalam proses kapasitasi meliputi morfologis, fisiologis, biokimia meliputi perubahan lipid dan protein serta regulasi ion – ion kalsium. Menurut Johnson and Everitt (1995), pada

proses kapasitasi terjadi perubahan membran spermatozoa yang terdiri dari perubahan metabolisme dan influk kalsium untuk mempersiapkan reaksi akrosom.

Pada kenyataannya spermatozoa membutuhkan senyawa spesies oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada konsentrasi rendah untuk menginduksi proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Sikka, 2004) serta dapat berikatan dengan zona pelucida (Sanocka and Kurpizs, 2004) sehingga proses fertilisasi dapat berjalan dengan baik. Pembentukan ROS secara berlebihan akan memicu stres oksidatif, berpotensi mengakibatkan toksik dan merupakan mediator penting terhadap berkurangnya fungsi dan kualitas spermatozoa (Aitken and Clarkson, 1987).

Stres oksidatif adalah suatu kondisi dimana terjadi peningkatan kerusakan seluler yang disebabkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*). Proses ini adalah hasil dari ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi pada ROS, dimana terjadi peningkatan pembentukan ROS tanpa diimbangi oleh eliminasinya oleh antioksidan dalam tubuh (Quratul'ainy, 2006).

Pada keadaan normal, aktifitas ROS yang terdapat di dalam tubuh dapat dikendalikan oleh sistem antioksidan, sehingga tidak mengganggu fungsi dan proses normal dari tubuh. Apabila keseimbangan antara jumlah ROS dan antioksidan dalam tubuh tidak baik, maka proses menetralkan ROS menjadi kurang sehingga dapat terjadi keadaan stres oksidatif. Stres oksidatif tersebut merupakan proses dari reaksi ROS dengan molekul sel dalam tubuh, sehingga sel tubuh dapat mengalami perubahan struktur dan fungsinya. Untuk meredam ROS yang masih tersisa perlu disediakan antioksidan tambahan seperti vitamin C,

vitamin E, asam urat, polyfenol (flavonoid), untuk meminimalisir efek ROS tersebut (Halliwell, 1991).

Antioksidan adalah molekul yang dapat dengan aman berinteraksi dengan radikal bebas dan dengan demikian mencegah kerusakan sel tubuh (Dahlia, 2011). Sementara radikal bebas adalah molekul yang pada orbit terluarnya mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sifatnya sangat labil dan sangat reaktif sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada komponen sel seperti DNA, lipid, protein dan karbohidrat (Chen *et al.*, 1996).

Tumbuhan mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) diketahui mengandung zat antioksidan dan banyak ditemukan pada bagian buah muda dan buah. Hal tersebut mungkin disebabkan karena komposisi buahnya mengandung senyawa flavonoid yang tinggi disamping senyawa alkaloid, saponin, fenolik hidrokuinon, tanin, steroid, mono terpen dan sesqui terpen (Arini dkk, 2003). Menurut Satria (2005) senyawa flavonoid mempunyai khasiat sebagai antioksidan dengan menghambat berbagai reaksi oksidatif serta mampu bertindak sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida dan radikal peroksil. Semakin tinggi kadar flavonoid maka potensi antioksidannya semakin tinggi.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian peroral ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat meningkatkan persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian peroral ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sehingga bisa dijadikan suplemen untuk meningkatkan potensi spermatozoa.

1.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah pemberian peroral ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat meningkatkan persentase kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

2.1.1. Klasifikasi mahkota dewa

Menurut Backer (1963) klasifikasi tanaman mahkota dewa adalah :

Kingdom	: <i>Thallophyta</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Bangsa	: <i>Archichlamydenae</i>
Suku	: <i>Thymelaeaceae</i>
Marga	: <i>Phaleria</i>
Jenis	: <i>Phaleria macrocarpa</i>

2.1.2. Morfologi mahkota dewa

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) termasuk famili *Thymelaeaceae*. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan perdu dengan ketinggian 1,5 – 2,5 meter, namun jika dibiarkan bisa mencapai ketinggian 5 meter. Tumbuhan mahkota dewa terdiri dari akar, batang, daun, bunga dan buah. Akarnya berupa akar tunggang. Batangnya terdiri dari kulit dan kayu. Kulitnya berwarna coklat kehijauan sementara kayunya berwarna putih. Batangnya bergetah dengan diameter 15 cm dan percabangannya cukup banyak (Harmanto, 2001).

Daun mahkota dewa merupakan daun tunggal, bentuknya lonjong berujung lancip. Sekilas menyerupai daun jambu air, tetapi lebih langsing dan teksturnya lebih liat. Warnanya hijau dengan daun muda lebih gelap daripada daun muda. Permukaannya licin dan tidak berbulu, bagian atas berwarna lebih tua daripada permukaan bagian bawah. Pertumbuhannya lebat dan panjangnya mencapai 7 – 10 cm, dengan lebar 3 -5 cm (Harmanto, 2001).

Bunga mahkota dewa merupakan bunga majemuk tersusun dalam kelompok 2 – 4 bunga, warnanya putih, bentuknya seperti terompet kecil dan baunya harum. Pertumbuhannya menyebar di batang atau ketiak daun. Ukurannya kira kira sebesar bunga tanaman cengkeh. Bunga ini keluar sepanjang tahun atau tak kenal musim, tetapi paling banyak muncul pada musim hujan (Lisdawati, 2002).



Gambar 2.1. Buah mahkota dewa
(sumber : Lubis,2013)

Buah mahkota dewa merupakan ciri khas dari pohon mahkota dewa, bentuknya bulat seperti bola pingpong sampai sebesar buah apel dan warnanya merah menyala. Kulit buah yang masih muda berwarna hijau dan menjadi merah jika sudah tua. Daging buah berwarna putih. Kulit dan daging buah merupakan bagian pohon yang paling sering digunakan untuk pengobatan (Harmanto, 2001).

2.1.3. Kandungan kimia dan manfaat

Menurut Lisdawati (2002) kandungan kimia dari buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) adalah alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol. Alkaloid dapat berfungsi menetralkan racun – racun dalam tubuh. Saponin dapat berfungsi sebagai sumber antibakteri dan antivirus, dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh, meningkatkan vitalitas, mengurangi kadar gula dalam darah dan mengurangi penggumpalan darah.

Flavonoid dan polifenol terdapat dalam kulit dan daging buah mahkota dewa yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa fenolik dikatakan memiliki aktivitas antioksidan, memungkinkan untuk menangkap baik ROS maupun elektrofil, menghambat nitrisasi dan memiliki potensi untuk autooksidasi serta kemampuan untuk memodulasi aktivitas enzim seluler tertentu. Dengan kata lain, mahkota dewa dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan untuk mengurangi efek yang ditimbulkan oleh senyawa radikal bebas. Flavonoid pada mahkota dewa juga telah diuji sebagai antimikroba alami.

Tumbuhan mahkota dewa mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, resin, tanin yang berhasiat untuk antihistamin, antioksidan, obat asam

urat, lever, rematik, kencing manis, ginjal, tekanan darah tinggi sampai kanker (Harmanto, 2003). Pengobatan kanker juga dilakukan menggunakan tanaman obat yang mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid memiliki kemampuan menangkap radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker (Sundaryono, 2011).

Mahkota dewa yang dikonsumsi secara berlebihan dikhawatirkan dapat bersifat nefrotoksik pada jaringan ginjal. Meskipun berat ginjal hanya 1% dari berat badan, tetapi ginjal secara terus menerus menerima sekitar 20% darah dari curah jantung. Hal tersebut menjadikan ginjal sangat peka terhadap bahan berbahaya yang ada didalam sirkulasi darah (Johnson *et.al.* 2000).

2.1.4. Sinonim dan nama lain untuk mahkota dewa

Sinonim tanaman mahkota dewa adalah *Phaleria Warb. Var. Wichanni* (Val) Back (Backer, 1963). Terdapat banyak nama sebutan untuk mahkota dewa. Di Indonesia, hampir tiap daerah mempunyai sebutan yang berlainan untuk mahkota dewa. Nama – nama daerah untuk mahkota dewa antara lain simalakama (Melayu), makuto rojo, makuto dewo, makuto ratu (Jawa), beluntas cina (Sumatra), raja obat (Banten) (Harmanto, 2001).

2.2. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau bisa dikenal dengan nama lain Norway rat berasal dari wilayah cina dan menyebar ke Eropa bagian barat (Sirois, 2005). Pada wilayah Asia Tenggara, tikus ini berkembang biak di Filipina, Indonesia, Laos, Malaysia, dan Singapore (Medway, 1983). Faktor yang

mempengaruhi perkembangan ekologi dan dinamika populasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) yaitu faktor biotik dan abiotik

Faktor abiotik yang penting dalam mempengaruhi dinamika populasi tikus adalah air minum dan sarang. Air merupakan kebutuhan yang penting bagi tikus. Sarang memiliki beberapa fungsi untuk kehidupan tikus, seperti untuk melahirkan, membesarkan anak – anaknya, menyimpan pakan, berlindung dari lingkungan yang kurang menguntungkan dan tempat untuk beristirahat. Cuaca tidak mempengaruhi secara langsung pada dinamika populasi tikus. Faktor biotik yang penting dalam mempengaruhi populasi tikus antara lain adalah (1) tumbuhan atau hewan kecil sebagai pakan (2) patogen (penyebab penyakit) dari golongan virus, bakteri, cendawan nematoda, protozoa, dan sebagainya, (3) predator dari golongan reptil, aves, dan mamalia, (4) tikus sebagai kompetitor, khususnya pada populasi tinggi (5) manusia merupakan musuh utama bagi tikus (Priyambodo, 1995).

2.2.1. Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Priyambodo (1995) ordo Rodentia merupakan ordo terbesar dari kelas mamalia karena memiliki jumlah spesies (40%) dari 5.000 spesies diseluruh dunia. Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Myers and Armitage (2004) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathia
Famili	: Muridae
Sub-famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki nama lain norway rat, termasuk ke dalam hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Ciri – ciri galur ini yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit. Telinga tikus ini lebih tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata tikus putih berwarna merah. Ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Bobot badan tikus jantan pada umur 12 minggu mencapai 240 gram sedangkan betinanya mencapai 200 gram. Tikus memiliki lama hidup berkisar antara 4 – 5 tahun dengan berat badan umum tikus jantan berkisar antara 267 – 500 gram dan betina 225 – 325 gram (Sirois, 2005). Tikus memiliki sepasang gigi seri berbentuk pahat yang tidak berhenti tumbuh pada setiap rahangnya, sehingga untuk mempertahankan ukurannya tikus terpaksa mengerat apa saja. Karakter fisik lainnya yaitu memiliki mata yang kecil, telinganya tidak berambut, dan ekor yang bersisik yang lebih pendek daripada panjang tubuh dan kepalanya. Warna umum dari *Rattus norvegicus* yaitu coklat atau abu – abu pucat atau coklat keabu – abuan, dapat juga abu abu putih, putih hitam, atau dua warna, namun tikus laboratorium biasanya merupakan bangsa albino dari *Rattus norvegicus* (Ballenger, 2002).

Rattus norvegicus melakukan aktivitasnya pada malam hari (*nocturnal*). Aktivitasnya seperti menggali lubang, mencari makan dan mempersiapkan sarang. Tikus termasuk omnivora (pemakan semua jenis makanan). Makanannya bisa berasal dari sampah, sabun, permen, buah – buahan, padi, benih, dan bahkan rodensia serta hewan lainnya (Myers and Armitage, 2004).

Tikus laboratorium jarang hidup lebih dari 3 tahun, berat badan pada umur 4 minggu dapat mencapai 35 – 40 gram dan setelah dewasa rata – rata 200 – 250 gram. Variasi berat badan ini tergantung galur, tikus jantan tua dapat mencapai 500 gram tetapi tikus betina jarang lebih dari 350 gram (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Total panjang tubuh 440 mm, panjang ekor 205 mm. Tikus laboratorium merupakan strain albino dari *Rattus norvegicus*. Tikus memiliki beberapa galur yang merupakan hasil pembiakan sesama jenis atau persilangan.



Gambar 2.2. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)
(Sumber: Arao *et.al.*, 2009)

2.2.2. Karakteristik reproduksi tikus putih

Tikus merupakan hewan politokus yang mampu melahirkan anak dalam jumlah banyak. Mencapai dewasa kelamin pada umur 50 – 60 hari, vagina mulai terbuka pada umur 35 – 90 hari dan testes turun atau keluar pada umur 20 – 50 hari (Malole dan Pramono, 1989).

Masa birahinya sepanjang waktu. Masa birahinya terbagi atas 4 periode yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Masing masing periode tersebut dapat diketahui melalui ulasan vagina (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Tikus betina akan estrus 4 -5 hari dan akan menerima jantan sekitar 12 jam, kemudian akan berovulasi secara spontan. Anak- anak yang sehat dan kuat akan dihasilkan jika tikus mulai dikawinkan pada umur 65 – 110 hari yaitu pada saat bobot betina mencapai 250 gram dan jantan 300 gram (Malole dan Pramono, 1989). Umumnya tikus mulai kawin pada umur 8 – 9 minggu, tetapi sebaiknya dikawinkan sebelum berumur 10 – 12 minggu (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Masa kebuntingannya relatif singkat yaitu 22 – 24 hari (Myesr and Armitage, 2004). Sejak 14 hari sudah terlihat adanya perubahan bentuk kelenjar ambing. Tikus jarang menunjukkan kebuntingan semu. Seperti pada mencit, kita dapat mengetahui kebuntingan tikus saat berumur 10 – 14 hari setelah ditemukan sumbat vagina dengan cara meraba perut atau dengan cara memeriksa adanya spermatozoa dalam usapan vagina (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Tikus putih termasuk ke dalam kelompok poligami. Satu jantan bisa mengawini 5 atau lebih betina (Farida, 2007).

2.2.3. Testis tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Testis berkembang dalam rongga abdomen dan pada kondisi normal bermigrasi ke dalam skrotum selama periode perkembangan fetus (Ganong, 1992). Menurut Frandson (1992) testis bervariasi pada tiap spesies dalam hal bentuk, ukuran, dan lokasi tetapi struktur utamanya sama. Temperatur skrotum $\pm 7^{\circ} \text{F}$ lebih rendah dibanding temperatur normal tubuh dan merupakan lingkungan yang sesuai untuk fungsi spermatogenik testis (Hafez, 2000). Testis terbungkus dalam kantong skrotum yang berfungsi melindungi testis dari gangguan luar berupa pukulan, panas, dingin dan gangguan mekanis lainnya. Fungsi terpenting yaitu bisa mempertahankan suhu testis sampai beberapa derajat dibawah suhu tubuh sehingga spermatogenesis berlangsung secara sempurna. Pada kondisi normal skrotum dapat melindungi suhu optimal testis dengan jalan mengkerut atau mengendorkan dinding skrotum (Ganong, 1992; Hardjopranjoto, 1995).

Ditinjau dari fungsinya, testis mempunyai fungsi yang penting yaitu reproduktif dan endokrinologi. Fungsi reproduktif menghasilkan spermatozoa yang dibentuk dalam testis (*tubulus seminiferus*) melalui proses spermatogenesis, sedangkan fungsi endokrinologi dari testis menghasilkan berbagai hormon steroid (androgen/testosteron dan estrogen) dan hormon nonsteroid (inhibin). Perkembangan dan fungsi testis dipertahankan oleh hormon gonadotropin FSH dan LH atau disebut ICSH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior ini distimulir oleh GnRH yang disekresikan oleh Hypothalamus (Frandson, 1992; Hardjopranjoto, 1995).

2.2.4. Penis tikus putih

Penis merupakan organ kopulasi pada hewan jantan, fungsi penis ada dua yaitu meletakkan semen ke dalam saluran reproduksi hewan betina dan untuk mengeluarkan urin. Bagian penis yang melekat pada tubuh disebut pangkal, bagian yang terbesar disebut badan, dan bagian ujung yang bebas disebut *glans penis* (Toelihere, 1979). Badan penis terdiri dari *corpus cavernosum* penis yang relatif besar dan diselaputi oleh suatu selubung fibrosa tebal berwarna putih, *tunica albuginea*. Dibagian ventral terdapat *corpus cavernicum urethrae*, suatu struktur yang relatif lebih kecil yang mengeliling *urethrae* (Toliehere, 1981).

2.2.5. Epididimis tikus putih

Epididimis merupakan saluran yang menghubungkan dan mengangkut spermatozoa dari testis menuju kelenjar ampula. Epididimis terletak dibelakang testis melekat pada tunika albiginea, merupakan saluran yang berliku – liku. Epididimis terdiri dari tiga bagian yaitu kepala (*caput*), badan (*corpora*), dan ekor (*cauda*). Fungsi epididimis yaitu pengangkutan atau transportasi, konsentrasi atau pengentalan, maturasi atau pendewasaan dan penyimpanan spermatozoa (Evans and Maxwell, 1987).

Spermatozoa menjadi matang didalam epididimis dan sisa sitoplasma (*cytoplasmic droplet*) berpindah dari pangkal kepala (*proximal droplet*) ke ujung bagian tengah spermatozoa (*distal droplet*). Pematangan atau maturasi spermatozoa mungkin dicapai atas pengaruh dari sel – sel epitel (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang berasal dari bagian cauda epididimmis telah memiliki

kemampuan membuahi oosit yang sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulasi (Hafez, 2000). Hal ini disebabkan karena spermatozoa yang ada dibagian cauda telah melewati proses pematangan dibagian caput dan corpus epididimis serta sudah memiliki kemampuan bergerak (motil) dan membuahi oosit yang sama dengan spermatozoa hasil dari ejakulasi (Axner *et al.*, 1999). Proses pematangan ditandai oleh berpindahnya butiran sitoplasma (*cytoplasmic droplet*) dari bagian proksimal ke distal ekor atau hilang sama sekali dari spermatozoa (Toelihere, 1993).

2.2.6. Kelenjar assesoris tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Kelenjar assesoris merupakan bagian terbesar dari semen dan mengandung karbohidrat, protein, asam amino, enzim, vitamin yang larut dalam air, mineral, asam sitrat dan bahan organik lainnya. Cairan assesoris ini berfungsi sebagai buffer terhadap sifat keasaman yang berlebih pada saluran genital betina dan mempunyai kandungan mineral yang seimbang (medium yang cocok untuk makanan) sehingga spermatozoa dalam semen mempunyai daya hidup lama (Frandsen, 1992).

2.3. Semen

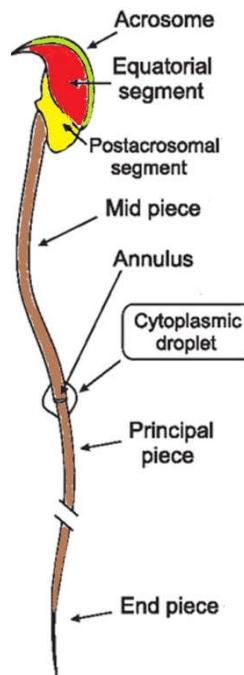
Semen terdiri dari dua bagian yaitu plasma seminalis dan spermatozoa atau sel kelamin jantan. Plasma seminalis diproduksi oleh kelenjar – kelenjar epididimis, vasa differentia, kelenjar vesikula seminalis, kelenjar prostat, kelenjar *bulbourethralis* (*cowper's*) dan kelenjar urethra, sedangkan spermatozoa

diproduksi di dalam tubulus seminiferus testis melalui spermatogenesis (Hardijanto dkk, 2010).

2.3.1. Spermatozoa

Spermatozoa sebagian besar berisi deoksiribonukleo protein, muko polisakarida, plasmalogen, dan protein yang menyerupai kreatinin serta menyelubungi bagian kepala sampai ekor spermatozoa yang berperan dalam elastisitas permukaan spermatozoa dan enzim serta co-enzim yang pada umumnya digunakan untuk proses hidrolisis dan oksidasi (Hayati, 2011).

Spermatozoa adalah sel kelamin yang memegang peranan penting dalam proses pembuahan. Cikal bakal spermatozoa sudah ada sejak embrio berupa sel – sel gonosit yang sudah aktif mengadakan pembelahan, sehingga menghasilkan spermatogonia (Hafez, 2000). Dijelaskan lebih lanjut bahwa pada masa pubertas, spermatogonia akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi spermatosit I yang kemudian memasuki fase miosis, sehingga membentuk spermatid yang mempunyai jumlah kromosom separuh dari jumlah kromosom sel sebelum miosis (haploid). Spermatid kemudian akan mengalami proses perubahan bentuk melalui tahap – tahap yang panjang yang disebut spermiogenesis dan pada akhir spermiogenesis ini akan dihasilkan spermatozoa yang mempunyai struktur spesifik sesuai dengan fungsinya untuk membuahi sel telur. spermatozoa terdiri atas bagian kepala, leher, dan ekor.



Gambar 2.3. Spermatozoa tikus
(Dorazon *et al.*, 2011)

Menurut Hardijanto dkk (2010) bagian kepala spermatozoa mengandung materi hereditas paternal dan bagian luarnya dibungkus oleh penutup kepala spermatozoa dan dibawahnya terdapat akrosom yang mengandung banyak fosfolipid. Inti spermatozoa terdapat dibagian kepala dan mempunyai ukuran kira – kira sepertiga panjang kepala, mengandung bahan genetik yang dibutuhkan pada saat membuahi sel telur. inti spermatozoa mengandung kromosom yaitu separuh dari jumlah kromosom inti yang diploid pada sel somatik. Pada bagian kepala juga terdapat bagian yang sangat penting yaitu akrosom. Pada bagian akrosom ini terdapat enzim spesifik antara lain hialuronidase, *corona penetrating enzim* (CPE), dan akrosin. Ketiga enzim tersebut mempunyai peranan penting pada proses fertilisasi.

Bagian leher spermatozoa mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian ini berakhir pada cincin sentriol yang kemungkinan berfungsi mengkoordinir rebtetan kontraksi – kontraksi dari serabut – serabut fibril itu (Hardijanto dkk, 2010).

Ekor spermatozoa menyerupai flagellum. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria didalamnya. Mitokondria mengandung emzim – enzim yang berhubungan dengan metabolisme eksudatif spermatozoa. Bagian ini kaya akan fosfolipid, lesithin dan plasmalogen. Plasmalogen ini mengandung satu aldehid lemak dan satu asam lemak. Asam lemak dapat dioksidasi dan merupakan energi endogen untuk aktivasi spermatozoa (Hardijanto dkk, 2010)

2.3.2. Plasma semen

Plasma semen adalah cairan yang dikeluarkan oleh saluran – saluran alat kelamin jantan seperti epididimis, vas deferen, ampula dan kelenjar – kelenjar asesoris. Plasma semen ini dibedakan dengan cairan – cairan tubuh lainnya karena mengandung bahan – bahan organik dalam kadar yang tinggi seperti kholin dalam bentuk bebas maupun terikat (posforil-kholin dan glyseril posforil kholin), asam sitrat, fruktosa, sarbitol, inositol, ergotonin dan bahan – bahan organik lainnya yang hanya sedikit ada didalam cairan tubuh, sedangkan bahan – bahan anorganik yang kadarnya tinggi dalam cairan semen adalah kalium, kalsium, karbonat dan fosfat (Hardijanto dkk, 2010).

2.4. Kapasitas Spermatozoa

Konsep kapasitas merupakan perubahan sel spermatozoa yang baru mengalami ejakulasi sehingga mampu melakukan fertilisasi. Kapasitas terdiri dari : (1). Kemampuan melakukan reaksi akrosom, (2). Kemampuan dalam melakukan ikatan dengan zona pelucida, (3). Mendapatkan kemampuan hipermotilitas. Kapasitas merupakan proses yang terjadi sejak memasuki kanalis servikalis untuk menghilangkan penutup kepala spermatozoa (Manuaba dkk, 2003).

Pelepasan penutup membran plasma seperti sterol, lapisan lemak, glikoprotein menyebabkan membran plasma menjadi kurang stabil dengan lapisan luar membran akrosom sehingga dapat menyatu. Penyatuan kedua membran tersebut akan mempermudah pengeluaran enzim di dalamnya seperti hialoronidase, faktor neuramidase, pemecah komolus oophorus dan proteinase, akrosin yang sangat berguna saat spermatozoa melakukan penembusan ke ovum (Manuaba dkk, 2003).

Selama proses kapasitas ini terjadi perubahan sifat biokimia dan biofisik pada spema dan terutama pada membran plasmanya. Kapasitas sperma berhubungan erat dengan adanya perubahan pada fluiditas membran, konsentrasi ion intraseluler, dan metabolismenya. Proses kapasitas menyebabkan sperma menjadi responsif terhadap induktor untuk terjadinya reaksi akrosom. Perubahan yang dapat diamatai dalam proses kapasitas sperma adalah adanya perubahan pola dalam motilitasnya sehingga sperma menjadi hiperaktif. Hiperaktivitas sperma dicirikan oleh pergerakan flagela yang “tegas” dan tidak linear, hilangnya

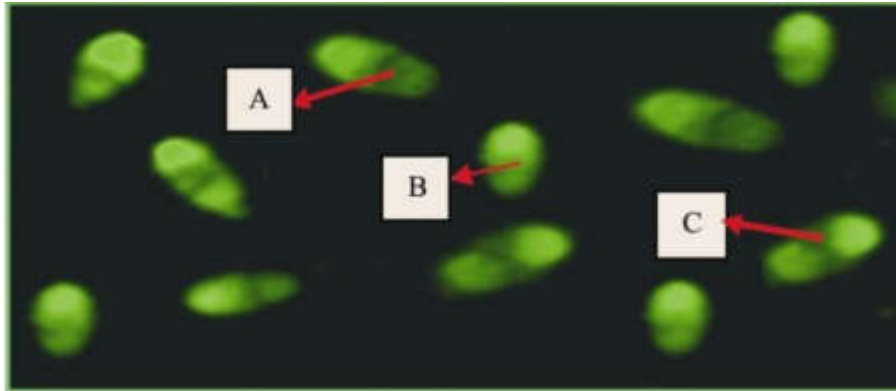
kolesterol dari membran plasma, destabilisasi membran, peningkatan pH intraseluler dan peningkatan konsentrasi Ca^{2+} , kemudian diikuti oleh aktivasi sistem *second messenger*. Selain ion Ca^{2+} , konsentrasi ion Na^+ , Cl^- , K^+ dan bikarbonat juga berperan dalam memodulasi proses kapasitasi sperma. (Darzon, 2006; Purohit *et al.*, 1999. Dikutip oleh Asmarinah, 2010).

Kapasitasi adalah peningkatan hipermotilitas spermatozoa dalam kecepatan maju dan gerak bandulan kepalanya yang sebagian besar terjadi diampula tuba (Manuaba, 2003).

Kapasitasi spermatozoa dimaksudkan untuk menghilangkan faktor dekapasitasi (melindungi stabilitas membran plasma spermatozoa) yang terkandung didalam plasma semen sehingga kapasitasi dan reaksi akrosom dapat terjadi (Wattimena, 2006).

2.5. Reaksi Akrosom

Reaksi akrosom adalah reaksi pelepasan enzim – enzim dari akrosom untuk menembus lapisan ovum dengan diinduksi oleh protein zona. Salah satu protein zona yang menginduksi akrosom adalah akrosin. Enzim akrosin ini adalah bentuk aktif dari proakrosin. Reaksi akrosom juga merupakan proses eksositosis yang melibatkan fusi antara membran plasma dengan membran luar akrosom yang ditandai dengan peningkatan kadar Ca^{2+} pada daerah equator membran kepala spermatozoa, sehingga kepala spermatozoa menjadi labil dengan terlepasnya beberapa enzim yang ada di akrosom (Utomo, 2011).



Gambar 2.4. Spermatozoa Domba Pewarnaan FITC. A=kapasitasi, B=non-kapasitasi, C=reaksi akrosom
(Sumber : Utomo, 2011)

Reaksi akrosom hanya terjadi pada spermatozoa yang mempunyai membran utuh. Selain itu reaksi akrosom juga berlangsung saat spermatozoa akan melakukan penetrasi pada zona pelucida. Sebelum melakukan penetrasi terhadap zona pellucida, spermatozoa harus menjalani reaksi akrosom dengan mensekresikan enzim tertentu yaitu proaksin yang kemudian diaktifkan menjadi akrosin (Utomo, 2011).

Purohit *et al.*, (1999) yang dikutip Utomo, (2011) menyatakan bahwa peristiwa yang pertama dari reaksi akrosom pada spermatozoa adalah agregasi reseptor yang distimulasi oleh ZP3 dan progesteron. Agregasi reseptor diikuti oleh aliran dari membran dan perubahan sistolik yang terjadi pada spermatozoa. Salah satu agen yang menginisiasi reaksi akrosom adalah ion kalsium. tanpa ion kalsium maka reaksi akrosom tidak akan terjadi, karena spermatozoa harus tetap bertahan cukup lama sehingga konsentrasi ion K^+ harus dijaga tetap tinggi dan pada saat yang sama konsentrasi Na^+ dan Ca^+ dijaga agar tetap rendah dalam cairan

intraseluler. Kondisi diatas sangat berpengaruh terhadap kelangsungan hidup spermatozoa.

Selain induktor ZP3 dan progesteron yang merupakan induktor fisiologis terdapat juga induktor non fisiologis seperti kalsium ionophore. Induktor – induktor tersebut kemudian akan memodulasi kaskade sinyal pada bagian kepala sperma yang melibatkan proses aktivasi kanal-kanal ion pada membran plasma. Aktivasi kanal ion tersebut selanjutnya menyebabkan keluar masuknya ion – ion tertentu sehingga terjadi perubahan membran potensial di dalam kepala sperma. Perubahan tersebut memicu peningkatan ion Ca^{2+} didalam sperma yang selanjutnya menyebabkan terjadinya inisiasi proses reaksi akrosom yaitu mulai terjadinya fusi antara membran plasma sperma dengan membran luar akrosom (Darzon, 2006; Purohit *et al.*,1999. Dikutip oleh Asmarinah, 2010).

Menurut Breitbart dan Naor (1999) menyatakan bahwa mekanisme molekuler yang terjadi pada reaksi akrosom karena teraktivasinya PKA menyebabkan *channel voltage* Ca^{2+} membuka, sehingga Ca^{2+} dalam akrosom keluar ke sitoplasma. Konsentrasi Ca^{2+} yang tinggi dalam sitoplasma menyebabkan fosfolipase C (PLC) aktif dan akan memecah *phosphatidrilinositol Diphosphate* (PIP) menjadi *Diacylglycerol* (DAG) dan *Inositol Triphosphate* (IP3). IP3 termetilasi menjadi *Inositol Tetrphosphate* (IP4) dan menyebabkan channel Ca^{2+} membuka, Ca^{2+} ekstraseluler masuk dan membran bersifat fusogenik ungu terjadi fusi membran. Setelah terjadi fusi membran, terjadi vesikulasi dan hilangnya membran akrosom plasma dan membran luar yang memungkinkan pelepasan enzim – enzim tersebut antara lain :

hialuronidase, corona penetrating enzyme (CPE), akrosin, neuromidase, ATP-ase, fosfatase, asparatil amidase dan glukoronidse. Menurut Hafez (2000) dari ketujuh enzim tersebut yang mempunyai fungsi penting dalam menembus lapisan yang dioovum adalah enzim *hialuronidase*, CPE dan akrosin.

Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa untuk menjalani reaksi akrosom pada dan tempat yang tepat spermatozoa harus mampu bertahan cukup lama dalam konsentrasi K^+ intraseluler dijaga tetap tinggi dan konsentrasi Na^+ dan Ca^{2+} dijaga tetap rendah yang sangat penting bagi kelangsungan hidup spermatozoa selain itu juga berfungsi sebagai pelindung dari reaksi akrosom *premature* bagi spermatozoa. Keadaan ini diatur oleh ikatan Na^+ -K-ATPase (memompa ion Na^+ keluar dari sel, ion K^+ masuk ke dalam sel) dan Ca^{2+} -K-ATPase (memompa Ca^{2+} keluar dari sel).

Kalsium yang masuk akan menyebabkan keadaan kalsium intra seluler meningkat dan akan memenuhi tempat penyimpanan kalsium. Ikatan ligan dan reseptor akan menghasilkan *second messenger* IP3 yang diberikan ROOC pada akrosom dan menyebabkan dikeluarkannya kalsium ke sitoplasma. Peningkatan kalsium di sitoplasma akan emnghambat kemampuan IP3 untuk mengaktivasi kanal dan kalsium tersebut akan tetap masuk dalam mitokondria. Sehingga digunakan berbagai enzim fosforilasi untuk mensintesa ATP. Selain itu kalsium juga berikatan dengan reseptor protein dalam sel, seperti protein kinase (Utomo, 2011).

2.6. Reactive Oxygen Species (ROS)

2.6.1. Pengertian ROS

Radikal bebas adalah molekul yang pada dasarnya tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas ini akan mencari pasangan untuk berikatan. Pada dasarnya semua biomolekul berpasangan untuk mencapai kestabilan, sehingga untuk mencapai kestabilan ini radikal bebas akan mencari elektron bebas yang lain untuk berikatan mencapai kestabilan. Sifat dari oksigen (O_2) pada dasarnya akseptor elektron sehingga akan menerima elektron bebas walaupun sudah mencapai kestabilan, sehingga akan membentuk superoksida (O_2^-), radikal – radikal bebas yang berikatan dengan oksigen ini disebut dengan Reactive Oxygen Species (ROS) (Danusantoso, 2003). ROS adalah molekul yang tidak berpasangan dan oleh karena itu sangat tidak stabil dan sangat reaktif. ROS hanya dapat bertahan dalam hitungan millisecond ($10^{-9} - 10^{-12}$) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan dirinya (Turan B, 2010; Makker *et al.*, 2009; Bender, 2009. Dikutip dari Widayati, 2011)

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan oksidan yang sangat reaktif dan mempunyai aktivitas yang berbeda. Dampak negatif senyawa tersebut timbul karena aktivitasnya, sehingga dapat merusak komponen sel yang sangat penting untuk mempertahankan integritas sel. Setiap ROS yang terbentuk dapat memulai suatu reaksi berantai yang terus berlanjut sampai ROS itu dihilangkan oleh ROS yang lain atau sistem antioksidannya (Wijaya, 1996. Dikutip dari Maslachah, dkk, 2008).

Mekanisme utama dalam proses kerusakan membran spermatozoa oleh ROS adalah pada reaksi peroksidasi lipid atau LPO (*Lipid Peroxidation*). Peningkatan hidrogen peroksida akan menurunkan ATP intraseluler dan fosforilasi protein axonemal. Selain itu juga dapat menginduksi proses peroksidasi lipid yang akan menimbulkan kematian sel (Widayati, 2011).

2.6.2. Sumber pembentukan ROS

Secara umum, radikal terbentuk melalui salah satu cara sebagai berikut : 1. Melalui absorpsi radiasi (ionisasi, sinar UV, radiasi sinar nampak, radiasi panas) atau 2. Melalui reaksi redoks, dengan mekanisme reaksi fusi ikatan homolitik atau pemindahan elektron (Trenggono, 1991. Dikutip oleh Panghiyangani dkk., 2009).

ROS terdiri dari *superoksidaradical* (O_2^-), *Hydrogen peroksida* (H_2O_2), *Hydroxyl Radical* (OH), dan *Singlet Oxygen* (O_2^-) yang akan meningkat jika terpapar sinar UV, radiasi ionik dan jika terpapar polusi (Kunwar dan Priadarsini, 2011). Radiasi sinar rontgen maupun sinar ultraviolet merupakan sumber pembentukan ROS yang cukup penting, mengingat kedua sinar tersebut dapat melisiskan air menjadi radikal OH. Selain itu ion logam seperti Fe^{2+} , CO^{2+} dan Cu^+ juga dapat bereaksi dengan oksigen atau hidrogen peroksida (Botham, 2009; makker, 2009. Dikutip oleh Widayati, 2011). Menurut penelitian Panghiyangani dkk. (2009) Radiasi sinar ultraviolet dapat meningkatkan pembentukan senyawa oksigen reaktif (ROS).

Sumber ROS yang lain adalah berasal dari respiratory burst dari makrofag yang teraktifkan. Aktivasi makrofag ini menyebabkan peningkatan penggunaan

glukosa melalui lintasan pentosa fosfat yang dipakai untuk mereduksi NADP menjadi NADPH dan peningkatan penggunaan oksigen yang dipakai untuk mengoksidasi NADPH guna menghasilkan superoksida dan halogen radikal sebagai agen yang sitotoksik untuk membunuh mikroorganisme yang telah difagosit (Botham, 2009; Makker, 2009. Dikutip dari Widayati, 2011)

Oksidasi terhadap kkoenzim flavin tereduksi didalam mitokondria dan rangkaian transport electron dalam mikrosome berlangsung melalui serrangkaian langkah dimana radikal flavin semiquanon distabilkan oleh protein pengikat dan membentuk radikal oksigen (superoksida) sebagai hasil sementara atau sampingan. Meskipun hasil akhirnya bukanlah radikal bebas, namun akibat dari sifat radikal yang tidak dapat diprediksi diperkirakan terdapat kebocoran radikal bebas sebanyak 3 – 5 % dari 30 mol oksigen yang dikonsumsi setiap hari sebanyak 1,5 mol ROS (Botham, 2009; Ladiges, 2010. Dikutip dari Widayati, 2011).

Didalam tubuh, senyawa reaktif ini dapat berasal dari produk samping rantai pernafasan di dalam mitokondria. Oksigen yang masuk ke dalam tubuh sekitar 90% masuk ke mitokondria. Pada saat proses respirasi di mitokondria, oksigen terlibat dalam pembentukan ATP dengan mengikutsertakan enzim – enzim respirasi. Dalam proses respirasi, oksigen mengalami reduksi dalam rangkaian elektron transfer di dalam mitokondria . proses reduksi oksigen tersebut dapat menghasilkan radikal bebas dan hidrogen peroksida sebagai senyawa antara. Selanjutnya dinyatakan bahwa radikal bebas bersifat sangat reaktif (Rizal dan Herdis, 2010).

2.6.3. Stres oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu kondisi dimana terjadi peningkatan kerusakan seluler yang disebabkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Proses ini adalah hasil dari ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi ROS dimana terjadi peningkatan pembentukan ROS tanpa diimbangi oleh eliminasinya oleh antioksidan dalam tubuh. Pembentukan ROS adalah proses fisiologi tubuh namun apabila terjadi peningkatan yang berlebihan maka akan dapat berpengaruh negatif terhadap tubuh. Selain merusak membran plasma, stres oksidatif juga dapat merusak integritas DNA pada nukleus spermatozoa. Kerusakan DNA ini pada akhirnya akan menginduksi terjadinya apoptosis sel yang pada akhirnya menyebabkan turunnya jumlah spermatozoa (Quratul'aini, 2006).

Kadar ROS yang meningkat akan meningkatkan stress oksidatif. Stress oksidatif diduga merupakan salah satu penyebab infertilitas dengan memberikan pengaruh negatif pada kualitas spermatozoa seperti peningkatan kehilangan motilitas, kerusakan membran, penurunan morfologi normal, viabilitas dan kemampuan kapasitas spermatozoa. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan senyawa ROS membentuk ikatan kovalen dengan komponen biomolekul didalam sel. Jika hal ini terjadi maka akan terjadi keruntuhan sel biomolekul penyusun sel yang berakibat kerusakan dan hilangnya fungsi sel spermatazoa (Panghiyangani, 2001; Dahlan, 2002. Dikutip dari Panghiyangani dkk., 2009).

2.6.4. Antioksidan Sebagai Penawar

Menurut Kochlar dan Rossell (1990) serta Shui *et al.* (2004) yang dikutip Panjaitan (2004) Antioksidan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid dengan cara menunda atau mencegah terjadinya reaksi autooksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid.

Di dalam sistem biokimia terdapat keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan, sehingga jaringan tubuh terhindar dari kerusakan akibat ROS (Makker, 2009; Rachman, 2012. Dikutip oleh Widayati, 2011). Ketika terjadi peningkatan kadar ROS, tubuh akan merespon dengan memproduksi enzim CAT, HPx dan SOD untuk menetralkan ROS. Namun demikian tetap ada sebagian ROS yang masih tersisa, terutama bila produksi ROS berlebihan. Untuk meredam ROS yang tersisa perlu disediakan antioksidan tambahan seperti vitamin C, vitamin E, asam urat, Polyfenol (Flavonoid), dll untuk meminimalisir efek ROS tersebut (Afnas'ev, 2010; Bender, 2009; Kefer *et al.*, 2009; Milczarek, 2010. Dikutip oleh Widayati, 2011).

Tubuh memerlukan antioksidan yang berupa senyawa kimia yang memiliki kemampuan untuk memberikan hidrogen radikal untuk memadamkan oksigen radikal (Rice-Evan dan Miller, 1996). Sebagai akibatnya, senyawa tersebut mampu mengubah sifat radikal menjadi nonradikal dan terjadi perubahan oksidasi oleh antioksidan. Struktur molekul antioksidan, bukan hanya memiliki kemampuan melepas atom hydrogen, tetapi juga mengubah radikal menjadi reaktivitas rendah sehingga tidak terjadi reaksi dengan lemak atau molekul lain (Chainwithesuk *et al.*, 2004)

Keberadaan antioksidan dapat ditemukan secara endogen yang dihasilkan oleh tubuh sendiri dan eksogen yang berasal dari makanan. Antioksidan yang berasal dari makanan berasal dari tanaman telah lama dikenal potensinya dan telah lama diketahui untuk menstabilkan senyawa radikal yang dapat diukur aktivitas oksidannya (Stahl dan Sies, 2003).

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Unit Hewan Coba Fakultas Kedokteran, Laboratorium Inseminasi Buatan Fakultas Kedokteran Hewan, Laboratorium Farmakologi Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, dan Institute Tropical Disease (ITD), Universitas Airlangga, Surabaya. Di laksanakan pada bulan Oktober - November 2015.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Hewan percobaan

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 2 – 3 bulan dengan berat badan rata – rata 200 gram.

3.2.2. Bahan penelitian

Bahan penelitian ini meliputi : semen dari tikus putih (*Rattus norvegicus*), ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), aquades, ether, CMC Na serbuk, larutan CMC Na 0,5%, pewarna *Fluorescent Isotiocianat* (FITC) con A (sigma), pakan ayam standar (HI-PRO-VITE), NaCl fisiologis.

3.2.3. Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kandang hewan coba, tempat minum, gunting, pinset, tabung penampung semen berskala, mikroskop *fluorescent*, gelas objek, gelas penutup (*Cover glass*), tabung reaksi, rak tabung, sonde lambung, penangas, mortir, pengaduk kaca, timbangan, cawan petri, pipet, spuit 5 ml, aluminium foil, kertas tissue, mesin rotafavor dan pompa vacuum.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pembuatan ekstraksi buah mahkota dewa

Proses ekstraksi buah mahkota dewa di lakukan dengan cara : buah mahkota dewa diangin - anginkan dalam ruang tertutup dengan temperature kamar 27,5 °C dan tidak terkena sinar matahari langsung, ini bertujuan supaya zat yang terkandung tidak terurai. Setelah kering dilakukan penimbangan untuk mengetahui susutnya berat basah setelah pengeringan. Selanjutnya dibuat serbuk halus dengan blender dan dilakukan pengayakan, lalu dilakukan penimbangan kembali. Masing – masing serbuk halus tanaman tersebut dilakukan maserasi menggunakan etanol 96 % dan dilakukan perendaman di dalam toples kaca selama 24 – 48 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, supaya prosesnya cepat dan efisiensi waktu dibantu menggunakan pompa vacuum. Hasil saringan berupa cairan bening dilakukan penguapan dengan mesin penguap (evaporator) dengan suhu 50 – 55 °C sampai pada akhirnya menjadi

ekstrak kental. Cairan kental tersebut disebut dengan ekstrak etanol buah mahkota dewa.

3.3.2. Perlakuan terhadap hewan coba

Tikus putih umur 2 – 3 bulan dengan berat ± 200 gram diadaptasikan selama 7 hari. Hewan coba terdiri dari 1 kelompok kontrol negatif dan 3 kelompok perlakuan. Masing – masing kelompok terdiri dari 5 tikus putih dan dipilih secara acak.

1. Perlakuan kontrol (P0) terdiri dari lima ekor tikus putih diberi CMCNa 0,5 % sebanyak 1 ml.
2. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari lima ekor tikus putih diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 7,5 mg/200 g BB sebanyak 1 ml.
3. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari lima ekor tikus putih diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 15 mg/200 g BB sebanyak 1 ml.
4. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari lima ekor tikus putih diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 30 mg/200 g BB sebanyak 1 ml.

Pemberian perlakuan diberikan selama 14 hari. Kelompok kontrol negatif (P0) hanya diberi CMC Na 0,5% dan kelompok perlakuan P1,P2, dan P3 tikus diberi perlakuan dengan ekstrak buah mahkota dewa masing – masing sebanyak 7,5 mg/kgBB, 15 mg/kgBB, dan 30 mg/kgBB per hari. Pemberian ekstrak buah mahkota dewa dilakukan dengan peroral dengan memasukkannya ke dalam lambung tikus. Semua tikus perlakuan mendapat pakan ayam standar (HI-PRO-VITE). Pada akhir perlakuan, semua tikus percobaan dieutanasia dengan

menggunakan ether dan dilakukan koleksi testis (Aulanni'am dkk., 2007). Spermatozoa diambil dari epididimis yaitu tepatnya dibawah chorda spermatica. Ditempat tersebut diklem, kemudian dipotong. Bagian yang dipotong tadi dikeluarkan spermanya dengan cara dipencet pada bagian epididimis, kemudian diberi NaCl fisiologis dan kemudian diaduk agar menjadi homogen. Spermatozoa diperiksa secara makroskopis dan sebagian spermatozoa yang lain diletakkan diatas gelas objek, ditutup dengan gelas penutup diperiksa dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 10 – 40 x untuk diperiksa secara mikroskopis. Kemudian spermatozoa diperiksa menggunakan mikroskop epifluorescence.

3.3.3. Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis

Semen segar yang baru ditampung harus segera diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis dilakukan dengan melihat dan mencatat warna semen, kekentalan semen (encer, sedang, dan kental).

Pada pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler untuk melihat gerakan massa, motilitas spermatozoa

3.3.4. Pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa

Semen perlakuan difiksasi dengan 4% formal dehyde, kemudian dicuci dengan menambahkan PBS 3 ml dan disentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit, supernatan dibuang dan ditambahkan dengan 0,3 ml FITC con A (Sigma) dengan konsentrasi 10 µg/ml dalam PBS *dulbecos*. *Staining* dilakukan selama 25 menit pada suhu ruangan, selanjutnya dicuci 2 kali dengan sentrifugasi 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan digoreskan pada *flow labs slide*

(specimen), ditetesi dengan gliserol 90%. Selanjutnya specimen diamati dengan mikroskop *epifluorecent* (Nikon Japan) dengan *excitation B* (eksitasi 490 rpm dengan emisi 525 nm) untuk mengetahui fluoresen pada spermatozoa hasil FITC. (Utomo, 2011).

3.3.5. Definisi Operasional

Gambaran yang tampak dalam pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom menggunakan mikroskop epifluourosence adalah :

- a. Kepala spermatozoa bagian atas berfluorescence (Spermatozoa mengalami kapasitas)
- b. Kepala spermatozoa tidak berfluorescence dan hanya bagian aquatorial yang berfluorescence (Spermatozoa mengalami reaksi akrosom) (Susilowati, 2007)

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel bebas

Variabel bebas yang diamati adalah dosis ekstrak buah mahkota dewa.

3.4.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kapasitas dan reaksi akrosom.

3.4.3. Variabel kendali

Variabel kendali meliputi spesies hewan, jenis kelamin, umur, suhu ruang percobaan, pakan dan cara pengambilan semen.

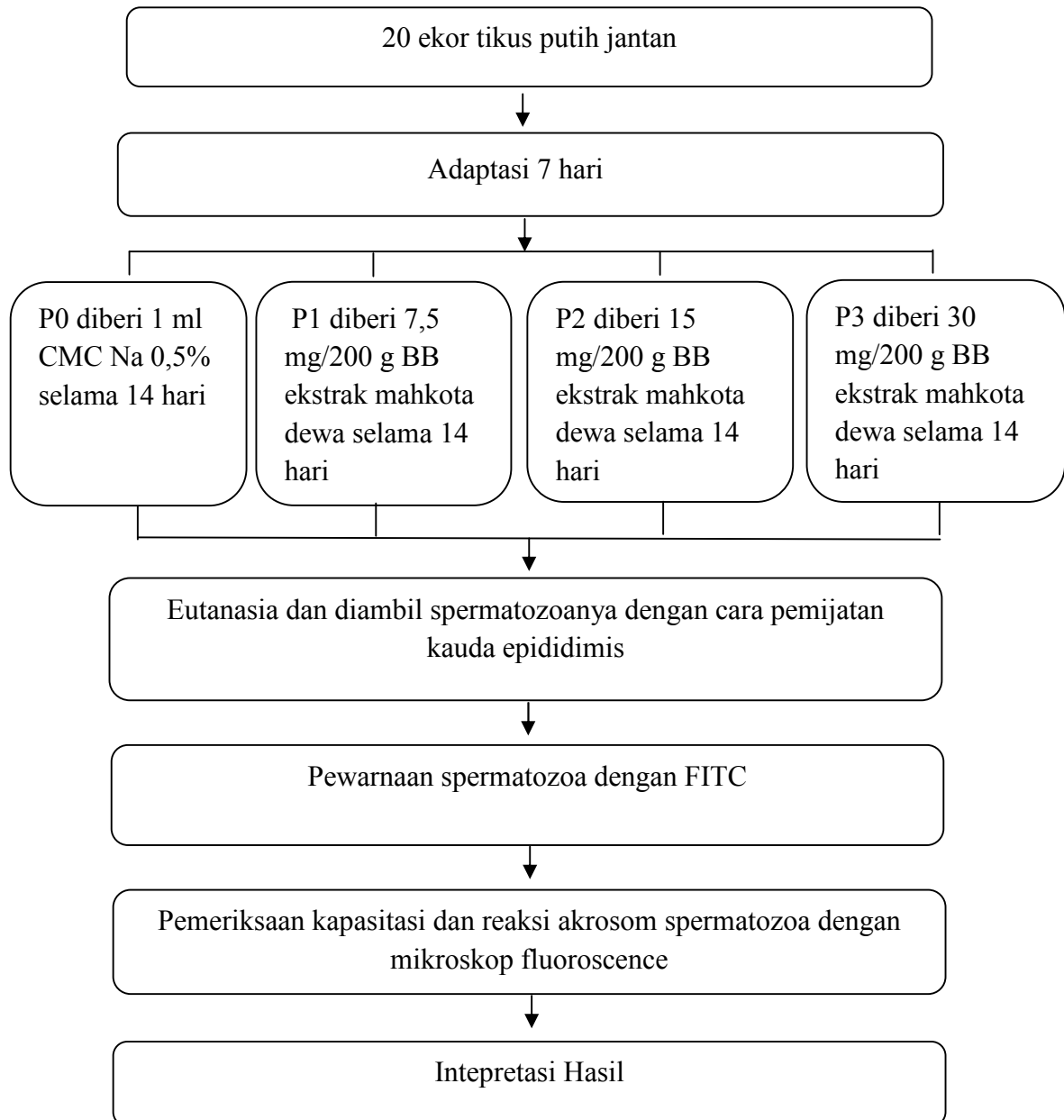
3.5. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan empat ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan perhitungan $t(n-1) \geq 15$, t adalah perlakuan dan n adalah ulangan (Kusriningrum, 2008).

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan analisis varian (ANOVA) menggunakan uji F dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan's dengan tingkat signifikan 5 % (Kusriningrum, 2008).

3.7. Alur Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1. Pemeriksaan Awal Spermatozoa

Semen tikus (*Rattus norvegicus*) sebelum diperiksa untuk melihat kapasitas dan reaksi akrosom dibawah mikroskop Epifluorescence terlebih dahulu diamatai kondisi spermatozoa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi warna dan kekentalan sedang pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas dan gerakan masa.

Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis terlihat pada Tabel 4.1 dan 4.2 :

Tabel 4.1. Hasil pemeriksaan semen tikus (*Rattus norvegicus*) secara makroskopis

Perlakuan	Warna	Kekentalan
P0	Putih/krem	Kental
P1	Putih/krem	Kental
P2	Putih/krem	Kental
P3	Putih/krem	Kental

Tabel 4.2. Hasil pemeriksaan semen tikus (*Rattus norvegicus*) secara mikroskopis

Perlakuan	Gerakan masa	Motilitas (%)
P0	++	65
P1	++	66
P2	++	68
P3	++	64

4.2. Persentase Kapasitas Spermatozoa

Hasil pemeriksaan kapasitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) setelah dilakukan pewarnaan dengan FITC (*Flourescent Isotiocianat*) dan diamati dengan mikroskop epifluouescence perbesaran 400x ditampilkan pada Tabel 4.3. :

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan kapasitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Persentase Kapasitas ($\bar{X} \pm SD, \%$)
P0	19,20 ^a \pm 4,39
P1	24,80 ^b \pm 3,35
P2	30,00 ^b \pm 4,24
P3	28,00 ^b \pm 4,00

Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

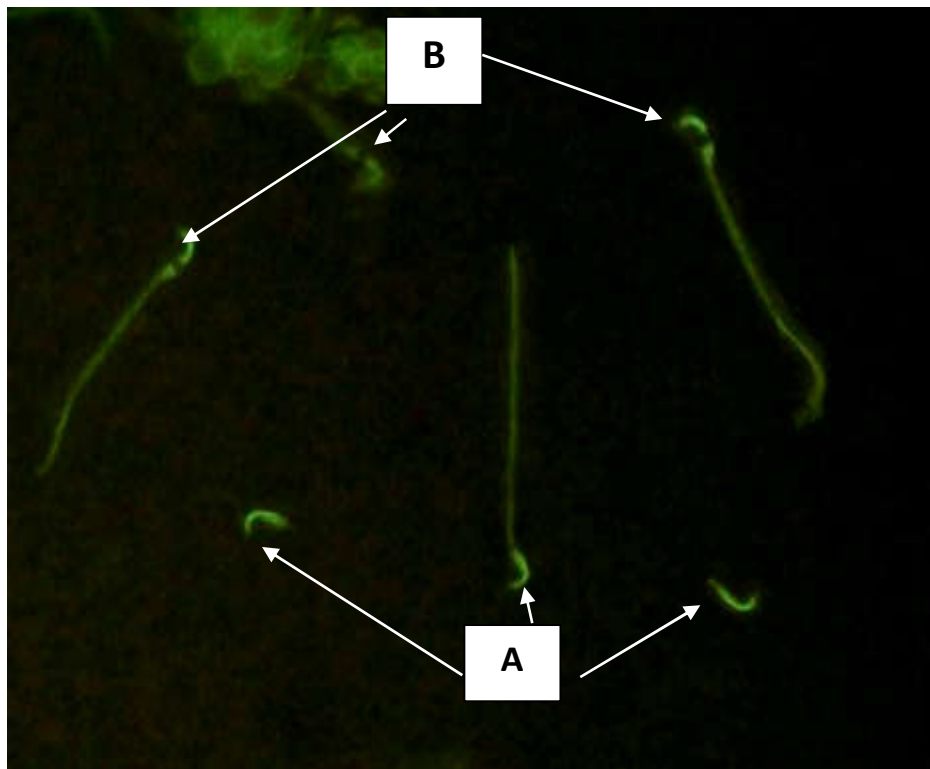
Keterangan :

1. Perlakuan kontrol (P0) terdiri dari tikus putih yang diberi 1 ml CMC Na 0,5%
2. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 7,5 mg/200 mgBB
3. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 15 mg/200 mgBB
4. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 30 mg/200 mgBB

Berdasarkan Tabel 4.3. dapat diketahui bahwa kelompok kontrol (P0) menunjukkan persentase kapasitas sebesar $19,20 \pm 4,93 \%$, hasil P0 berbeda nyata terhadap P1, P2 dan P3. Pada kelompok P1 menunjukkan persentase kapasitas sebesar $24,80 \pm 3,35 \%$, hasil P1 tidak berbeda nyata terhadap P2 dan P3 tetapi berbeda nyata terhadap P0. Pada kelompok P2 menunjukkan rata-rata hasil persentase kapasitas sebesar $30,00 \pm 4,24 \%$, hasil dari P2 tidak berbeda nyata

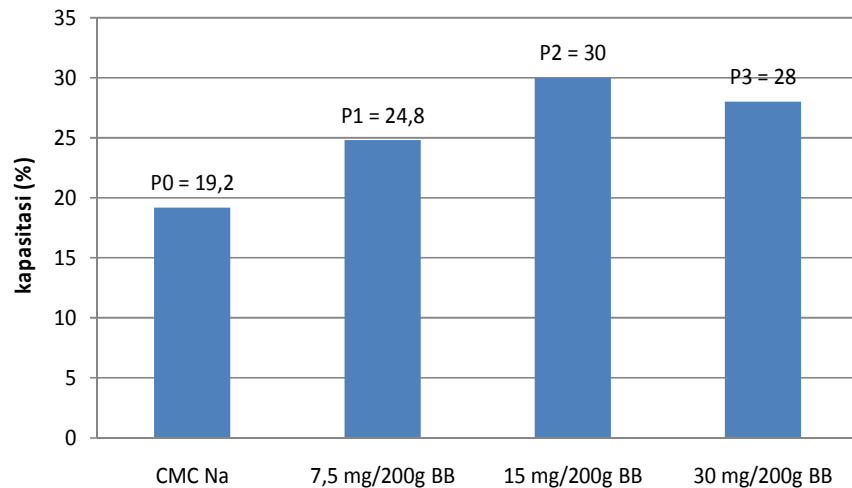
terhadap P1 dan P3 tetapi berbeda nyata terhadap P0 sedangkan kelompok P3 menunjukkan rataan persentase sebesar $28,00 \pm 4,00 \%$, hasil P3 tidak berbeda nyata terhadap P1 dan P2 namun berbeda nyata terhadap P0.

Pemeriksaan persentase kapasitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi ekstrak daging buah mahkota dan diamati dengan menggunakan mikroskop *epifluorescence* perbesaran 400 kali dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Spermatozoa tikus putih yang diwarnai dengan FITC (*Flourescent Isotiocianat*). A. Kapasitas (terdapat akrosom intak dan bagian atas kepala spermatozoa berflourescence), B. Reaksi akrosom (tidak terdapat akrosom intak dan pada kepala spermatozoa bagian aquatorial berflourescence).

Hasil persentase kapasitas spermatozoa dapat dilihat dalam diagram batang pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Diagram batang hasil persentase kapasitas spermatozoa tikus putih.

4.3. Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa

Hasil pemeriksaan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) setelah dilakukan pewarnaan dengan FITC (*Flourescent Isotiocianat*) dan diamati dengan mikroskop epifluouescence perbesaran 400x ditampilkan pada Tabel 4.4.:

Tabel 4.4. Hasil pemeriksaan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Persentase Reaksi Akrosom ($\bar{X} \pm SD, \%$)
P0	2,00 ^a \pm 2,00
P1	3,60 ^{ab} \pm 1,67
P2	5,60 ^b \pm 0,89
P3	4,00 ^{ab} \pm 1,41

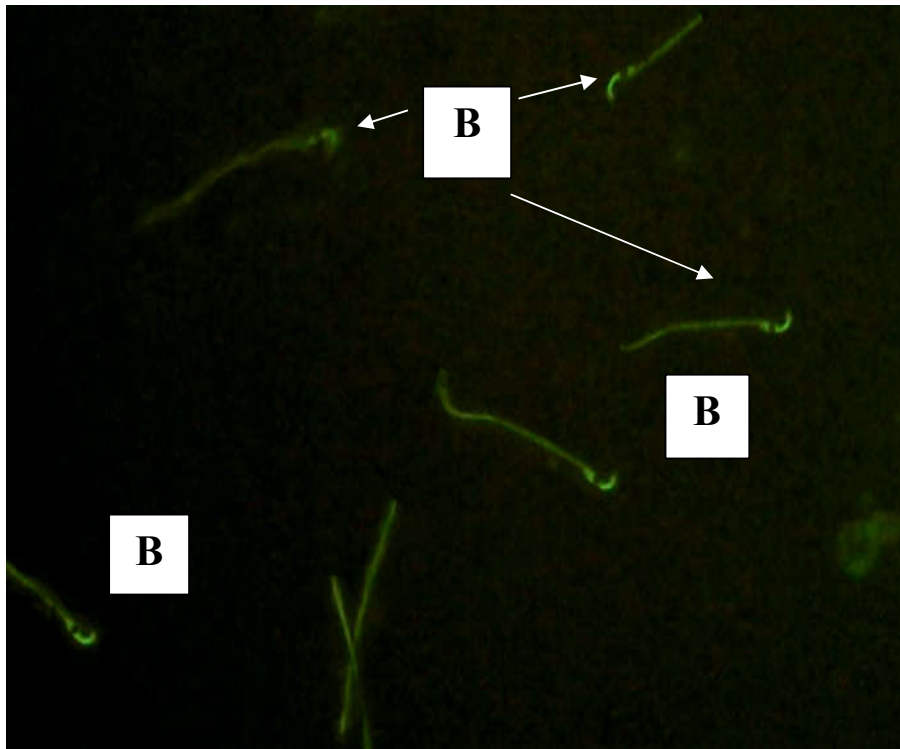
Superskrip yang berbeda dalam satu kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Keterangan :

1. Perlakuan kontrol (P0) terdiri dari tikus putih yang diberi 1 ml CMC Na 0,5%
2. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 7,5 mg/200 mgBB
3. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 15 mg/200 mgBB
4. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari tikus putih yang diberi ekstrak daging buah mahkota dewa 30 mg/200 mgBB

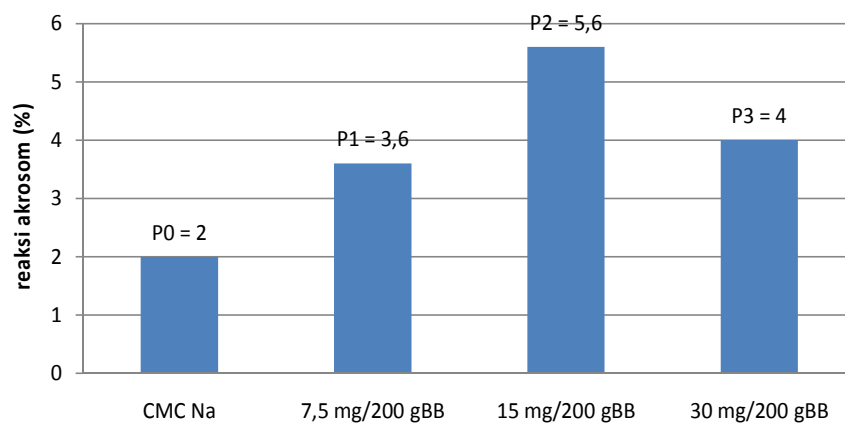
Berdasarkan tabel 4.4. dapat diketahui bahwa kelompok kontrol (P0) menunjukkan rata-rata persentase reaksi akrosom sebesar $2,00 \pm 2,00$ %, hasil P0 tidak berbeda nyata terhadap kelompok P1 dan P3 tetapi berbeda nyata terhadap kelompok P2. Pada kelompok P1 menunjukkan persentase reaksi akrosom sebesar $3,60 \pm 1,67$ %, hasil kelompok P1 tidak berbeda nyata terhadap kelompok P0 dan P2 dan P3. Pada kelompok P2 menunjukkan rata-rata reaksi akrosom sebesar $5,60 \pm 0,89$ %, hasil kelompok P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kelompok P1 dan P3 namun berbeda nyata terhadap kelompok P0. Sedangkan rata-rata reaksi akrosom kelompok P3 menunjukkan nilai sebesar $4,00 \pm 1,41$ %, hasil dari kelompok P3 tidak berbeda nyata terhadap P0, P1 dan P2.

Pemeriksaan reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi ekstrak daging buah mahkota dan diamati dengan menggunakan mikroskop *epifluorescence* perbesaran 400 kali dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3. Spermatozoa tikus putih yang diwarnai dengan FITC (*Flourescent Isotiocianat*). B. Reaksi akrosom (tidak terdapat akrosom intak dan pada kepala spermatozoa bagian aquatorial berfluorescence)

Hasil reaksi akrosom spermatozoa dapat dilihat dalam diagram batang pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Diagram batang hasil reaksi akrosom spermatozoa tikus putih.

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1. Persentase Kapasitas Spermatozoa

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat memberikan pengaruh terhadap persentase kapasitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*). Pada kelompok P1 dan P2 mengalami peningkatan persentase kapasitas setelah pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan masing masing dosis 7,5 mg/200g BB dan 15 mg/200mg BB. Sementara P0 menunjukkan hasil persentase kapasitas terendah.

Pada kelompok P0 mempunyai persentase kapasitas terendah. Hal ini diduga karena pada perlakuan kontrol tidak ada antioksidan yang mengendalikan produksi ROS. Ini sesuai dengan pernyataan Saleh dan Agarwal (2002) bahwa ROS pada level tinggi berpotensi toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa dalam hal ini adalah kapasitas. Terdapatnya radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa ditandai dengan meningkatnya pembentukan senyawa ROS sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa serta mengubah kestabilan dan fungsi membran (Sikka, 2004) sehingga akan menurunkan fertilitas. Padahal kemampuan spermatozoa untuk mengadakan fertilisasi harus didukung oleh membran spermatozoa yang memiliki integritas (keutuhan) dan fluiditas (kelenturan) optimum. Integritas dan fluiditas yang baik diperlukan untuk berlangsungnya proses kapasitas dan reaksi akrosom.

Pada kenyataannya dalam kondisi normal spermatozoa menghasilkan ROS dalam jumlah yang sedikit untuk regulasi sperma hal ini dikarenakan spermatozoa membutuhkan senyawa spesies oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada konsentrasi rendah untuk menginduksi proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Sikka, 2004). Sejalan dengan pernyataan tersebut, menurut Saleh dan Agarwal (2002) ROS yang terdapat pada semen harus inaktif atau kecil kadarnya, kadar yang kecil diperlukan untuk mengatur fungsi normal sperma seperti kapasitasi dan reaksi akrosomal.

Di dalam tubuh segala sesuatu diatur agar tetap dalam kondisi yang seimbang. Jika kondisi keseimbangan ini tidak bisa dicapai maka akan berpengaruh negatif terhadap tubuh. Begitupun dengan kadar ROS, jika antara produksi dan eliminasi ROS tidak seimbang dimana terjadi peningkatan yang berlebihan dalam produksi tanpa diimbangi dengan eliminasinya oleh antioksidan dalam tubuh mengakibatkan stress oksidatif. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan senyawa ROS membentuk ikatan kovalen dengan komponen biomolekul didalam sel. Jika hal ini terjadi maka akan terjadi keruntuhan sel biomolekul penyusun sel yang berakibat kerusakan dan hilangnya fungsi sel spermatazoa (Panghiyangani, 2001; Dahlan dan Tjokronegoro, 2002. Dikutip dari Panghiyangani, 2009)

Spermatozoa mudah rusak oleh induksi stress oksidatif karena membran selnya banyak mengandung asam lemak tidak jenuh ganda (Dahlan dan Tjokronegoro, 2002). Pernyataan ini diperkuat oleh Soehadi (1996) dalam Panghiyangani (2009) Spermatozoa merupakan sel yang sangat peka terhadap

oksidasi karena mengandung PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) dengan konsentrasi tinggi sehingga ROS akan menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Perubahan parameter sperma seperti motilitas, viabilitas, kapasitas dan reaksi akrosomal spermatozoa akan menurunkan kemampuan fusi antara spermatozoa dan ovum yang menyebabkan gangguan fertilisasi.

Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 menunjukkan peningkatan persentase kapasitas. Hal itu sesuai dengan fungsi salah satu dari senyawa flavonoid sebagai antioksidan. Senyawa flavonoid telah terbukti memiliki banyak manfaat yaitu sebagai antioksidan, antikarsinogenik, antimikroba, antimutagenik, antiinflamasi, dan mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler (Alfarisi dan Lee, 2007 dalam Saryono dkk., 2015). Sebagai salah satu antioksidan kelompok flavonoid berperan melalui penangkapan (*scavenger*) radikal bebas secara langsung (Nijveldt *et al.*, 2001; Amic *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2002 dalam Astuti, S., 2008). Awalnya flavonoid teroksidasi oleh senyawa radikal, kemudian berubah menjadi stabil karena bereaksi dengan radikal flavonoid lain sehingga membentuk senyawa radikal fenoksil yang kurang reaktif, sehingga reaktifitas radikal bebas dapat diredam.

Kelompok perlakuan P3 menunjukkan penurunan rata-rata persentase kapasitas. Hal ini diduga karena pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) berlebih menjadikan toksik bagi spermatozoa sehingga akan menyebabkan kerusakan morfologi spermatozoa terutama pada membran sel. Hal ini sesuai dengan pernyataan Zabri *et al.* (2008) bahwa penurunan integritas membran spermatozoa berasal dari pemberian antioksidan yang berlebihan.

Pemberian antioksidan hanya akan berfungsi ketika ada senyawa prooksidan (pemicu proses oksidasi) dalam tubuh.

Kerusakan membran sel akan mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel termasuk sel spermatozoa (Suhadi, 1996 dalam Sukmaningsih, 2011). Apabila produksi ATP mitokondria rendah dan berkurangnya ATP intraseluler dengan cepat akan berakibat pada kerusakan aksonem, penurunan viabilitas spermatozoa, meningkatnya kerusakan morfologi midpiece serta kehilangan kemampuan kapasitasi dan reaksi akrosom (Sikka, 1996 dalam Sukmaningsih, 2011).

5.2. Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa

Hasil rata – rata reaksi akrosom pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memberikan pengaruh terhadap reaksi akrosom spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*). Kelompok perlakuan P1 dan P2 mengalami peningkatan reaksi akrosom setelah pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sedangkan kelompok perlakuan P0 memberikan hasil terendah.

Reaksi akrosom merupakan proses eksositosis yang melibatkan fusi antara membran plasma dengan membran luar akrosom yang ditandai dengan peningkatan kadar Ca^{2+} pada daerah equator membran kepala spermatozoa, sehingga kepala spermatozoa menjadi labil dengan terlepasnya beberapa enzim yang ada di akrosom (Susilawati, 2003 dalam Utomo, 2011), sedangkan menurut

Flesch and Gadella (2000) dalam Utomo (2011) menyatakan bahwa reaksi akrosom hanya terjadi pada spermatozoa yang mempunyai membran utuh.

Pada kelompok perlakuan P0 memberikan rata-rata hasil reaksi akrosom terendah. Sesuai dengan pernyataan di atas diduga rendahnya rata-rata hasil reaksi akrosom diakibatkan oleh membran spermatozoa yang sebagian besar terdiri dari asam lemak tak jenuh telah rusak oleh radikal bebas yang berlebihan mengingat sifat radikal bebas yang mudah mengoksidasi asam lemak tak jenuh sementara tidak ada antioksidan yang melindunginya. Zulfah (2006) menyatakan bahwa membran plasma spermatozoa mengandung fosfolipid dan asam lemak tak jenuh dalam jumlah besar, dimana asam lemak tak jenuh sangat rentan terhadap serangan radikal bebas terutama radikal hidroksil, sehingga ROS dapat dengan mudah menembus masuk membran plasma. Radikal hidroksil itu akan menimbulkan reaksi berantai yang disebut peroksidasi lipid. Akibat akhir rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik terhadap sel spermatozoa (Suryohudoyo, 2000; Zulfah, 2006). Lebih lanjut akan terjadi kerusakan pada membran sel yang mengakibatkan peningkatan fluiditas membran dan integritas membran sehingga akan mengganggu proses reaksi akrosom.

Pada kelompok perlakuan P1 dan P2 menunjukkan rata-rata hasil yang meningkat. Hal ini karena antioksidan yang terkandung dalam ekstrak daging buah mahkota dewa (Flavonoid) mampu melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan yang diakibatkan oleh oksidasi radikal bebas (ROS) sehingga integritas membran tetap terjaga dan reaksi akrosom dapat berlangsung. Sesuai

dengan pernyataan Zhao *et al.* (2009) bahwa keberadaan antioksidan didalam senyawa flavonoid pada ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat memberikan perlindungan terhadap membran plasma spermatozoa tikus putih. Pernyataan tersebut dikuatkan oleh penelitian Sumardani dkk. (2008) flavonoid dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari ROS yang berlebihan.

Sementara itu pada kelompok P3 mengalami penurunan reaksi akrosom. Hal ini sesuai dengan pernyataan Zabri *et al.* (2008) bahwa penurunan integritas membran spermatozoa berasal dari pemberian antioksidan yang berlebihan. Pemberian antioksidan hanya akan berfungsi ketika ada senyawa prooksidan (pemicu proses oksidasi) dalam tubuh. Menurut Silalahi (2001) Ketika dosis antioksidan dan oksidan tidak seimbang atau kadar antioksidan tinggi sedangkan prooksidan rendah maka tubuh akan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan keduanya dengan antioksidan, keadaan demikian akan membuat sel-sel radikal bebas tidak bisa diperbaiki lagi sehingga dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa yang selanjutnya akan berdampak pada terganggunya reaksi akrosom.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa dengan dosis 15 mg/200g BB pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang mengalami kapasitas dan reaksi akrosom.

6.2. Saran

Saran yang disampaikan oleh peneliti adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji lanjutan antara dosis 15mg/200g BB sampai dengan 30 mg/200g BB dalam penelitian tentang spermatozoa.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap histologi testis tikus putih (*Rattus norvegicus*).

RINGKASAN

Dhanang Estu Bagyo, Skripsi dengan judul **‘Pengaruh Pemberian Peroral Ekstrak Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Persentase Kapasitas dan Reaksi Akosom Spermatozoa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)’** yang dibimbing oleh Dr. Budi Utomo, drh., M. Si. selaku dosen pembimbing pertama dan Rudy Sukamto S, drh., M. Sc. selaku pembimbing kedua.

Kualitas spermatozoa dalam hal ini adalah Kapasitas dan reaksi akrosom dapat ditingkatkan dengan berbagai bahan kimia obat maupun bahan herbal. Bahan herbal dalam daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sangat berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa utama kandungan daging buah mahkota dewa sebagai antioksidan adalah flavonoid. Senyawa flavonoid dalam daging buah mahkota dewa yang tinggi membuat tanaman ini sangat berkhasiat untuk menangkal radikal bebas.

Pemberian daging buah mahkota dewa ini dalam bentuk ekstrak terhadap tikus dilakukan selama dua minggu secara *per oral*. Pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom dilakukakan dengan menggunakan pewarna *Fluorescent Isotiocianat* (FITC) yang kemudian diamati dibawah mikroskop fluorescence perbesaran 400x. Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dianalisis menggunakan ANOVA *One Way* dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat meningkatkan kualitas spermatozoa dalam hal ini adalah kapasitas dengan rerata hasil menunjukkan bahwa P1, P2, dan P3 berbeda nyata terhadap terhadap P0 sedangkan reaksi akrosom rerata hasil menunjukkan bahwa P0 berbeda nyata terhadap P2. Kelompok P2 merupakan kelompok dosis terbaik yang dapat meningkatkan persentase kapasitas dan reaksi akrosom.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat meningkatkan kualitas spermatozoa dalam hal ini adalah persentase kapasitas dan reaksi akrosom dengan dosis 15 mg/ 200 gBB tikus putih (*Rattus norvegicus*).

DAFTAR PUSTAKA

- Afanas'ev I. 2010. Signaling by Reactive Oxygent and Nitrogen Species in Skin Diseases. *Current Drug Metabolism*;11, 409-414.
- Aitken RJ, Clarkson JS. 1987. Cellular Basis of Defective Sperm Function and its Assosiation with the Genesis of reactive Oxygen Species by Human Spermatozoa. *J Reprod Fertil.*;81:459-469.
- Al-Farisi, M.A., and Lee C.Y. 2007. Optimization of phenolic and dietary fibre extraction frm date seeds. *Elsevier Journal*, 108 (3), 977-985.
- Amic, D., D. Beslo and N. Trinajstic. 2003. Structure-radical sacvenging activity relationship of flavonoids. *Croat Chem. Acta.* 76:56-61.
- Aulanni'am, M. Akmal, dan Rosmaidar. 2007. Efek antifertilitas fraksi air biji pinang (*Areca catechu*) sebagai agen apoptosis pada sel-sel jaringan testis *Rattus norvegicus*. *Jurnal Media Kedokteran Hewan.* 23(3):179-183.
- Arao, Y., Hakamata Y., Igarashi Y., Sato Y., Kayama F., Takahashi M., Kobayashi E., Murakami T., Characterization of hepatic sexual dimorphism in Alb-DsRed2 transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 24;382(1):46-50.
- Arini S, Nurmawan D, Alfiani F, Hertiani T. 2003. Daya antioksidan dan kadar flavonoid hasil ekstraksi etanol-air daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (scheff.) Boerl). *Buletin Penalaran Mahasiswa UGM*, 10 (1): 2-6.
- Asmarinah. 2010. Peran Molekul Kanal Ion Pada Fungsi Spermatozoa. *Maj Kedokt Indon* volum:60. Hal. 377.
- Astuti, S dkk. 2009. Kualitas Spermatozoa Tikus yang diberi Tepung Kedelai Kaya Isoflavon, Seng (Zn) dan Vitamin E. *Media Peternakan* Vol. 32 No. 1 April 2009 halaman 12-21.
- Axner, E., C. L. Forsberg and S. Einarsson. 1999. Morphlogy and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 45:767-777.
- Backer, P. 1963. *Medical Plan of East and Southeast Asia Atributed and Uses.* MIT London
- Ballenger, Liz. *The Diversity Web.* 2002. The University Of Michigan.

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 2000. Applied Animal Reproduction. 5th Ed. Prentice Hall. New Jersey *Bogor Agriculture University*
- Bender DA. 2009. Free Radicals an Antioxydant Nutrients. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al. Eds. Harpers Illustrated Biochemistry, Eds 28th Mc Graw Hill Lange;282-485.
- Breitbart H., and Z. Naor. 1999. Protein kinases in mammalia sperm capacitation and the acrosomal reaction reevisi Reproductin. J, Soc., reprod, And Fert. Vol 4:151-159.
- Botham KM, Mayes PA. Biologic Oxidation. In: Murray K, Bender DA, Botham KM, et al .Eds. Harper's Illustrated Biochemistry, Ed 28th Mc Graw Hill Lange 2009.p.63-82.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N. 2004. Screening of Antioxydant Activity and Antioxydant Compounds of Some Edible Plants of Thailand. Food Chemistry.
- Chen HM, Koji M, Fumio Y, Kiyoshi N. 1996. Antioxydant activity of designed peptides based on the antioxydant peptides isolated from digests of a soybean protein . J. Agric. Food Chem 44:2619-23.
- Cunningham , E.P. 1999. Recent developments in biotechnology as they related to animal genetic resources for food and aglriculture. Commision on Genetic Resources for Food and Agriculture.
- Dahlia, K. 2011. Perbandingan Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dengan *Ketoconazole* Dalam Menghambat Pertumbuhan *Pityrosporum ovale* [KTI]. Fakultas Farmasi. Universitas Diponegoro
- Dahlan, M.S. dan Arjatmo Tjokronegoro (2002). Oxidative Stress and Male Infertility: Phatophysiology Clinical Implication. Jurnal Kedokteran yarsi, 10(1): 50-59.
- Darzon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernadez Gonzzales EQ, Nishigaki T, Trevino CL, Wood C, Beltran C. 2006. Sperm Channel Diversity and Fungsional Multiplicity. *Reproduction* ;131;977-88.
- Danusantoso, H. 2003. Peran Radikal Bebas terhadap Beberapa Penyakit Paru. Jurnal Kedokteran Trisakti, 22(1), 31-36.
- Dasrul, Rasmaidar dan Abdul Haris. 2012. Efektivitas Penambahan Vitamin E (*alfa tokoferol*) dalam Medium Pencucian Sperma dengan Sentrifugasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman. Agripet: Vol(12) No. 2: 7-13.

- Dorazon, A., T. Nishigakhi, C. Beltran. 2011. Calcium Channels in The Development, Maturation and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev.* 91: 1305-1355.
- Diwyanto, Kusuma. 2008. Pemanfaatan Sumber Daya Lokal dan Inovasi Teknologi dalam Mendukung Pengembangan Sapi Potong Di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 1(3): 173-188.
- Evans, G and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamons Artificial Insemination of Sheep and Gats. Botter worths.
- Farida Andan, Nurul. 2007. Tampilan Anak Tikus (*Rattus norvegicus*) Dari Induk Yang Diberi Bovine Somatotropin (bst) pada Awal Kebuntingan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Flesh. FM. And BM. Gadella. 2000. Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in the Process of Fertilization. *Biochim Biohys Acta.* 1469: 197-235.
- Franson, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Terjemahan B. srigandono dan K. Praseno. Gajah Mada Universiy Press. Yogyakarta. 752-791.
- Ganong, W.S. 1992. Fisiologi Kedokteran. Terjemahan : A. Derma. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Guselli, A, Nardini, M., Baldi, A, and Scaccini, S, 1998. Antioxydant activity of different phenolic fraction separated from an Italian Red Wine. *J. Aric Food Chem.* 48 (2).
- Guyton and Hall. 1996. Volum Paru. In: Fisiologi Kedokteran. Ed 9th. Penerbit buku Kedokteran EGC 1996; 604
- Hafez ,E.S.E. 2000. Anatomy of Male Reproduction in : Reproduction in Farm Animals. Ed 7th Ed. Lea and Febriger. Philadelphia.
- Halliwell, B. 1991. Reactive Oxygent Species in Living System; Source, Biochemistry and Role in Human Decease. *Am. J. Med.* 91.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1999) Free Radicals un Biology anf Medicine. 3rd edn. Oxford : Clarendon Press
- Halliwell B and Whiteman M. 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do The Result Mean? *Br.J.Pharmacol.*
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito, T.W. Suprayogi. 2010. Buku AjarInseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

- Hardjoprano, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Harmanto, N. 2001. Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa. Agromedia Pustaka. Jakarta
- Harmanto, N. 2003. Conquering disease in unison with makota dewa, *Phaleria macrocarpa*. 1st edition. Jakarta : P.T. Makotadewa Indonesia
- Hayati, A. 2011. Spermatologi. Cetakan Pertama. Pusat Penerbitan dan Percetakan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Heim K.E., A.R. Tagliaferro & D.J. Bobilya. 2002. Flavonoid: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J. Nutr. Biochem.* 13:572-528.
- Herdis, M.R. Tolihere, I. Supriatna, B.Purwantara, RTS. Adikara. 2005. Optimalisasi Kulaitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) melalui Penambahan Maltosa ke dalam Pengencer Semen Tris Kuning Telur. *Media Kedokteran Hewan*. Vol. 21 No. 2 Mei. 88-92.
- Herdis. 2012. Pengaruh Waktu Penampungan Semen Terhadap Gerakan Massa Spermatozoa dan Tingkah Laku Kopulasi Pejantan Domba Gart. *J. Sains dan Teknologi Indonesia*. 14 : 38-43.
- Jaswandi, Boediono A., dan M.A. Setiadi. 2001. In Vitro maturation and fertilization of ovine oocytes in system with absence of 5% CO₂: 19-22.
- Johnson, M.H. and Everitt, B.J. 1995. *Essential Reproduction*, 4th ed. Blackwell Science, Oxford.
- Johnson, J.D., M.J. Ryan, J.D.I.I. Toft, S.W Graves., M.R. Hejtmancik, M. L. Cunningham, R.A. Herbert, and M. Kamal. 2000. Two – year toxicity and carcinogenicity study of mthyluguenol in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Journal of Agriculture and Food chemistry* 48(8): 3620-3632.
- Kanagawa, H., O.A. Mazni and C.A. Valdez. 1989. Oocyte Maturation and in vitro Fertilization in Far Animals. *Biotechnology for Livestock Production*. FAO. Roma pp. 79-95.
- Kefer JC, Argarwal A, Saanegh E. Role of Antioxidant In The Treatment af Male Infertility. *International Jurnal Of Urology* 2009; 16: 449-57
- Kochlar, S.P and Rossel, J.B. 1990. Detection Estimation of Antioxydant. Di dalam B.J.F. Hudson, ed. *Food antioxydant*. Elvisier Applied Science. london
- Kunwar, A., & Priyadarsani, K. 2011. Free Radicals, Oxydative stress and importance of antioxydant in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2), 53-60

- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Ladiges W, Wanagat J, Preston JB, et al. A Mitochondrial view of aging, reactive oxygen species and metastatic cancer. *Aging cell* 2010; 9, 462-465.
- Lisdawati. 2002. Buah Mahkota Dewa, Toksisitas, Efek Antioksidan Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi. Universitas Gajah Mada.
- Lubis, Najla. 2013. Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Sebagai Antiseptic pada Sabun Mandi Cair (Body Foam). Fakultas Pertanian Universitas Pembangunan Panca Budi. Medan.
- Malole, M.B.M dan C.S.U. Pramono. 1989. Penggunaan Hewan – Hewan Percobaan di Laboratorium. Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Manuaba I.B.G, Manuaba Chandra L.A., Manuaba Fajar I.B.G. 2003.. Pengantar Kuliah Obstetri. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative Stress and Male Infertility. *Indian J Med Res* 2009; 129; 357-67.
- Maslachah, L., Sugiharti, R., Kurniasanti, R. 2008. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species radikal Superoksida (O₂⁻) oleh Antioksidan Vitamin E pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik. *Jurnal Vol. 24, No.1. Media Kedokteran Hewan*.
- Medway, (1983). *The Wild Mammals of Malaya (Peninsula Malaysia) and Singapore*. Second Edition, Oxford University Press 1969, Oxford London Glasgow.
- Milczarek, Hallman A, Sokolowska E, et al. 2010 Melatonin enhances antioxidant action of α -tocopherol and ascorbat against NADPH and iron dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J Pineal Res*; 49, 149-53.
- Morrell, J.M. 2006. Update on Semen Teknologi for Animal Breeding. *Reproduction in domestic Animal*. 1.41: 63-67.
- Myers P and Armitage D. 2004. "*Rattus novegicus*". *Animal Diversity*
- Nijveldt, R.J., E. van Nood, D.E.C van Hoorn, P.G. boelens, K. Van Norren & P.A.M van Leeuwen. 2001. Flavonoid: a review op probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:418-428.
- Panghiyangani, R. 2001. Radikal Bebas dan Infertilitas Pria. Makalah Seminar Ilmiah Radikal Bebas dan Patogenitas Penyakit. FK UNLAM, Banjarbaru 17 Oktober.

- Panghiyangan, Roselina dan Mashuri. 2009. Kualitas Spermatozoa dan Aktivitas Enzim Katalase dala Darah Tikus Jantan Galuur Sprague Dawley (SD) yang Diradiasi Sinar Ultraviolet. *Jurnal Kedokteran Indonesia*, Vol. 1/NO.1/januari/2009.
- Panjaitan, T.D., Prasetyo, B dan Limanttara, L. 2004. Peran Karotenoid Alami dalam Menangkal Radikal Bebas. *Jurnal Universitas Sumatra Utara* hal. 79-86.
- Priyambodo. 1995. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Jakarta : Penerbit Penebar Swadaya.
- Purohit S B, Laloraya M, Kumar G P.1999. Role of ion and ion channel in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl* ;1;95-107.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2015. *Outlook Komoditas Pertanian Subsektor Peternakan Daging Sapi*. Pusat data dan sistem informasi pertanian. Sekeretaris jendral Kementerian Pertanian 2015.
- Quratul'aini, Sari. 2006. Pengaruh pemberian vitamin E terhadap jumlah spermatozoa mencit jantan strain balb/c yan diberi paparan asap rokok. *Universtias Diponegoro*. Semarang.
- Rachman, T . Peran ROS Terhadap Fungsi Spermatozoa. *Jurnal Andrologi Indonesia* 2012.
- Rahmawati E, Dewoto AR, Wuyung PE. 2006. Ainticancer activity study of ethanol extract of mahkota dewa fruit pulp (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) in C3H mouse mammary tumor induced by transplantation. *Medical Journal Indonesia*. 4(15): 217
- Rice-Evans C, Miller NJ. 1996. Antioxydant antivities of flavonoid as bioactive component of food, *Biochem Soc Trans*. 24: 790-795.
- Rizal , M dan Herdis. 2010. *Inseminasi Buatan pada Domba*. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta
- Saleh R.A. & A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from researh bench to clinical practice. *J. Androl*. 23:737-752.
- Sanocka, D. And M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygent species and sperm cells. *Reprod. Bil. Endocrinol*.2:12.
- Saryono, Retnani H, dan Santoso D. 2015. Seduhan biji kurma (*Phoenix dactlifera*) memperkuat membran plasma. *Jurnal Ners* Vol. 10 No. 2 Oktober 2015: 355-359.
- Satria E. 2005. Potensi antioksidan dari daging buah muda dan daging buah tua mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) Boerl.] [skripsi]. Bogor:

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

- Shui, G., Wong, S.P., Leong, L.P. 2004. Characterization of Antioxydant Levels During Storage of Manilkara zapota L. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7834-7841.
- Silalahi J. 2002. Senyawa Polifenol Sebagai Komponen Aktif yang Berkhasiat dalam teh. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 52 (10):361-4.
- Sikka, C.S. 1996. Oxydative stress and role of antioxydant in normal and abnormal sperm function. Department of urology, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Louisiana. USA
- Sikka, S.C. 2004. Role of oxydative stress and antioxydants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.* 25:5-18.
- Silalahi, J. 2001. Free Radicals and Antioxydant Vitamin in Degeneraive Disease. *The Journal of The Indonesian Medical Association*. 11: 1-13.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedure*. Elseveir Mosby, USA
- Smith J. B. dan Mangkoewidjojo, S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia. Jakarta
- Soehadi, Koentjoro. 1996. Species Oxygen Reactive dan Kualitas Spermatozoa. *Medika*, 10:786-789
- Soeksmanto, Arif dkk. 2007. Kandungan Antioksidan pada Beberapa Bagian Tanaman Mahkota Dewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymeleceae). *Jurnal Biodiversitas* Vol. 8 No.2 Hal. 92-95
- Stahl, W., Sies, H. 2003. Antioxydant Avtivity of Carotenoids. *Molecular Asfect of Medicine*. 24, 345-351.
- Sujoko, Heri., Setiadi, Muhammad Agus., Boediono, Arief. 2009. Seleksi Spermatozoa dengan Model Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner* September. Vol. 10 No. 3: 125-132.
- Sukra, Y., I. Djuwita, A. Boediono dan R. Golfiani. 1992. Studi tentang perkembangan teknik fertilisasi in vitro, kultur, pewarnaan kromosom dan penyayatan embrio dalam pross perekayasaan embrio. *Lapran Penelitian IPB-Bogor*.
- Sukmaningsih, A.A.Sg.A., Ermayanti, I Gusti A.M., Wiratmini, Ngurah I., Sudarti, Ni Wayan. 2011. Gangguan Spermatogenesis Setelah Pemberian Monosodium Glutamat Pada Mencit (*Mus musculus* L.). *Jurnal Biologi* XV(2): 49-52

- Sumardani, N., L. Tuty, H. Pollung. 2008. Viabilitas Spermatozoa Babi dalam Pengencer Beltsville Thawing Solution (BTS) pada Tiga Tempat Penyimpanan Berbeda. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Media Peternakan. 31: 81-86.
- Sundaryono, A. 2011. Uji Aktivitas senyawa flavonoid total dari *Gynura segetum* (lour) terhadap peningkatan eritrosit dan penurunan leukosit pada mencit (*Mus musculus*). Jurnal Exacta. 2(9): 8-16.
- Suryohudoo, P. 2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan Pertama Molekuler. Cetakan Pertama, Jakarta: CV. Sagung Seto. Hal 31-47.
- Susilowati, S. 2007. Peran Insulin Like Growth Factor-1 Complex Plasma Seminalis Kambing Terhadap Potensi Biologis Spermatozoa Hasil Sentrifugasi. Disertasi Universitas Airlangga Surabaya.
- Turan B. Role of Antioxydant in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complication. Current Pharmaceutical Biotechnology 2010; 11, 819-836.
- Toelihere, M.R. 1979. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa Bandung. Hal : 20 – 26; 75; 116-120; 126-127; 144.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung. 92-122
- Toelihere, M.R. 1993. Pengantar Praktikum Inseminasi Buatan. Edis Kelima. Departemen Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Hal 38-54.
- Tremallen, K. 2008. Oxidative Stress and Male Infertility – A Clinica Perspective. Human Reproduction Update, 1 – 16.
- Trenggono, Retni, I.S Tiasna, M. Mudijana. 1991. Peranan Radikal Bebas Oksigenasi yang Dipertimbangkan pada Hiperbarik Oksigen. Medika, 9(17): 740-750.
- Utomo, Budi. 2011. Suplementasi Akrosin Pada Semen Kambing Peranakan Etawa Pasca Thawing Terhadap Peningkatan Kualitas dan Potensi Spermatozoa.
- Wattimena, J. 2006. Pengaruh Inkubasi Terhadap Pola Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba In Vitro. JITV 11(4); 295-301.
- Widayati, Eni. 2011. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxydant. Universitas Islam Sultan Agung. Semarang.
- Wijaya A. 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. Forum Diagnostikum Prodia. Diagnostics Educational Services. 1-12.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian Fertilization. In E. knobiland J.D. Neil (eds) The Biology of Reproduction, 2nd Ed. Raven Press. New York.

- Zabri, H., C. Kodjo, J. Benie, Y. Bekro. 2008. Phytochemical Screening and Determination of Flavanoids in *Secamon afzelli* (Asclepiadaceae) Extracts. *Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2(8): 80-82
- Zulfah, Iffah. 2006. Pengaruh Pemberian Jus tomat (*Lycopersicum esculentum Mill*) Terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit Strain Baln/C Jantan Yang Dipapar Asap Rokok. Universitas Diponegoro. Semarang
- Zhao, B., D., C.L. Xu, M.J. Luo, Z.L. Chang, J.H. Tan. 2009. Protocol Optimization for Long Term Liquid Storage of Goat Semen in a Chemically Defined Extender. *J. Reproduction in Domestic Animals*. 44: 865-872.

Lampiran 1. Penghitungan dosis ekstrak daging buah mahkota dewa

Dosis normal ekstrak daging buah mahkota dewa pada manusia= 12 mg/ Kg BB
(Rahmawati dkk, 2006).

Faktor konversi untuk manusia 70 kg pada tikus dengan berat 200 g

Dosis ekstrak buah mahkota dewa untuk tikus 200 g adalah 0,018.

Dosis yang dikonversikan = 12 mg/Kg x 70 kg = 840 mg.

Dosis untuk 200 g tikus = 840 mg x 0,018 = 15,12 mg/200 g BB

Dosis untuk 200 g tikus = 840 mg x 0,018 = 15 mg/200 g BB

Dosis untuk kelompok P1 diturunkan setengah menjadi 7,5 mg/200 g BB

Dosis untuk kelompok P2 menggunakan dosis 15 mg/200 g BB.

Dosis untuk kelompok P3 menggunakan dua kali dosis menjadi 30 mg/200g BB.

Lampiran 2. Prosedur penampungan semen tikus

Penampungan dilakukan oleh dua orang, satu orang menyiapkan tikus yang akan dibedah, dan satu orang yang lainnya menyiapkan peralatan dan bahan yang akan digunakan menampung semen tikus putih.

Tikus putih di euthanasi dengan menggunakan ether, kemudian setelah itu tikus dipreparasi, kemudian diambil testis dan epididimis tikus dan dibersihkan dari jaringan ikat yang menempel. Bagian epididimis dipotong dan ditekan hingga cairan sekresi keluar kemudian ditetesi dengan NaCl 0,9 % sebanyak 5 tetes dan diaduk menjadi homogen di dalam pot organ.

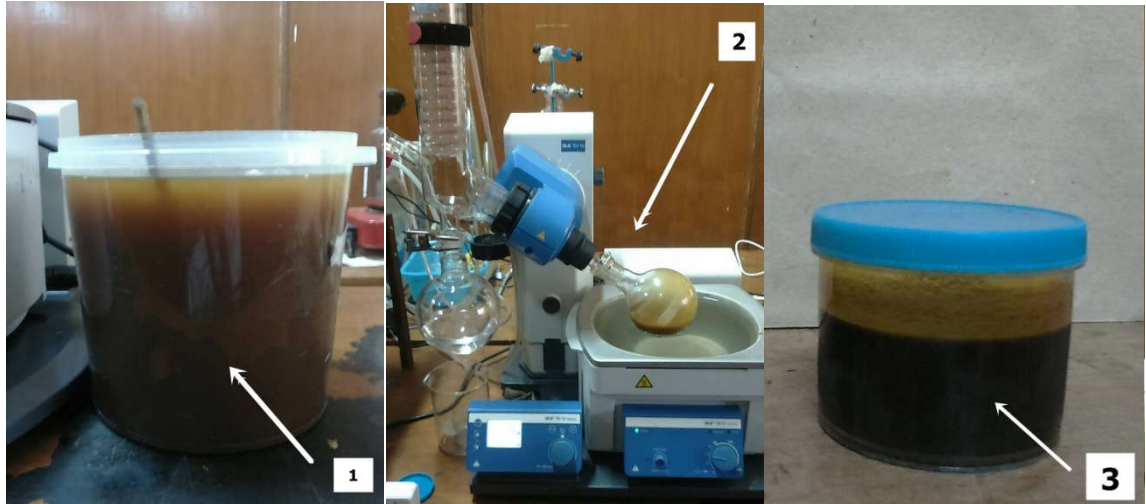
Lampiran 3. Prosedur pemeriksaan kapasitas dan reaksi akrosom

Pewarnaan dengan menggunakan FITC hendaknya sudah dipersiapkan terlebih dahulu reagen FITC yang akan digunakan mewarnai spermatozoa tikus putih, karena reagen FITC yang sudah dicampur dengan reagen lain harus diinapkan 24 jam.

Siapkan tabung baru untuk mencampur semen tikus dengan pewarna. Masukkan 0,2 ml semen segar tikus putih, kemudian tambahkan formaldehyde sebanyak 0,2 ml dan tunggu selama 5 menit. Setelah 5 menit tambahkan 0,2 ml reagen Flourescent Isotiocianat dan inkubasi selama 30 menit.

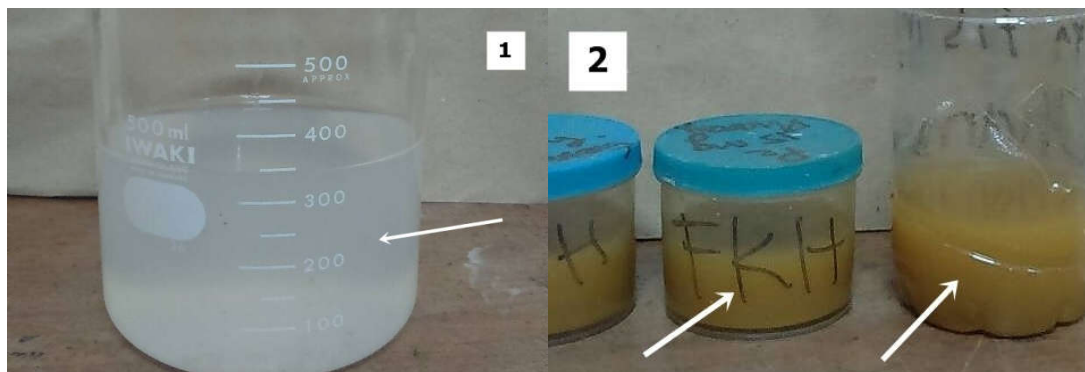
Setelah semen diwarnai dan diinkubasi selama 30 menit, periksa reaksi akrosom spermatozoa tikus putih dengan mikroskop epiflourescent dengan perbesaran 400x. Maka dapat terlihat yang mengalami kapasitas.

Lampiran 4. Dokumentasi penelitian



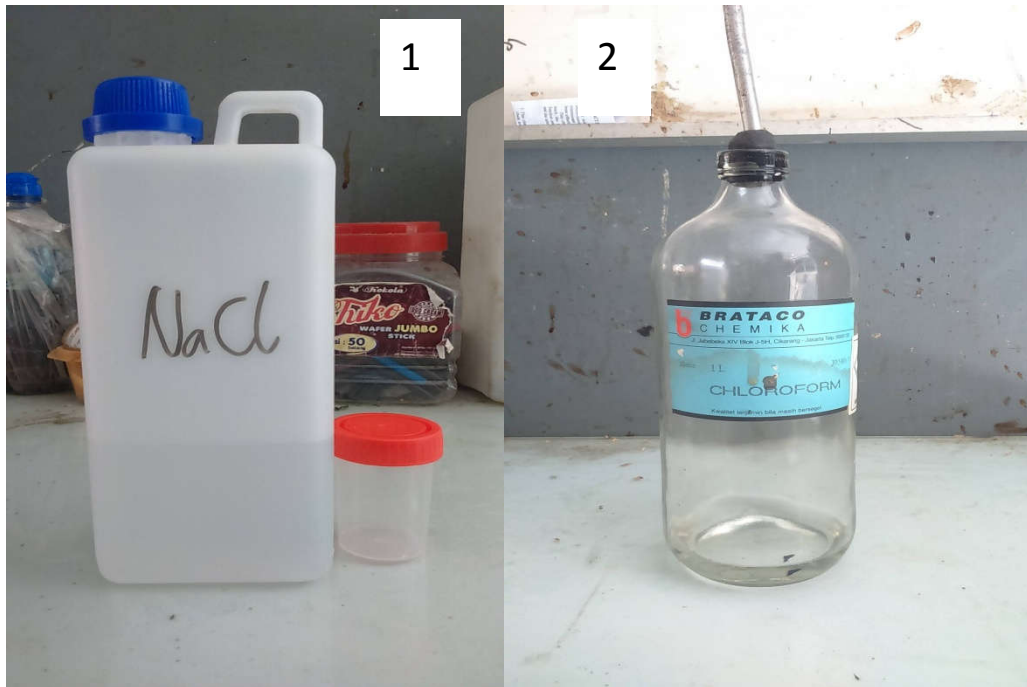
Keterangan :

1. Hasil dari pencampuran serbuk daging buah mahkota dewa dengan etanol 96% di dalam toples terbuka.
2. Alat ekstraksi untuk mengesktrak daging buah mahkota dewa.
3. Hasil ekstrak kental daging buah mahkota dewa di dalam pot organ.



Keterangan:

1. CMCNa 0,5 % yang sudah campur dengan aquades di dalam gelas beaker.
2. Cairan ekstrak daging buah mahkota dewa berbagai konsentrasi di dalam pot organ dan botol.



1. NaCl 0,9% fisiologis.

2. Cloroform



Pengambilan Organ Testis pada tikus

Lampiran 5. Hasil analisis statistik kapasitas

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
kapasitas * perlakuan	20	100,0%	0	0,0%	20	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			kapasitas
perlakuan	P0	1	16
		2	24
		3	24
		4	16
		5	16
	Total	N	5
		Mean	19,20
		Std. Error of Mean	1,960
		Std. Deviation	4,382
		Minimum	16
		Maximum	24
P1	1	22	
	2	22	
	3	26	
	4	30	
	5	24	
Total	N	5	
	Mean	24,80	
	Std. Error of Mean	1,497	
	Std. Deviation	3,347	
	Minimum	22	
	Maximum	30	
P2	1	24	
	2	30	

	3		36
	4		30
	5		30
		N	5
		Mean	30,00
		Std. Error of Mean	1,897
	Total	Std. Deviation	4,243
		Minimum	24
		Maximum	36
	1		30
	2		22
	3		30
P3	4		32
	5		26
		N	5
	Total	Mean	28,00
		Std. Error of Mean	1,789
		Std. Deviation	4,000
		Minimum	22
		Maximum	32
		N	20
		Mean	25,50
		Std. Error of Mean	1,247
	Total	Std. Deviation	5,577
		Minimum	16
		Maximum	36

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

Kapasitasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					P0	5		
P1	5	24,80	3,347	1,497	20,64	28,96	22	30
P2	5	30,00	4,243	1,897	24,73	35,27	24	36
P3	5	28,00	4,000	1,789	23,03	32,97	22	32
Total	20	25,50	5,577	1,247	22,89	28,11	16	36

Test of Homogeneity of Variances

kapasitasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,487	3	16	,696

ANOVA

kapasitasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	333,400	3	111,133	6,903	,003
Within Groups	257,600	16	16,100		
Total	591,000	19			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

kapasitasi

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P0	5	19,20	
P1	5		24,80
P3	5		28,00
P2	5		30,00
Sig.		1,000	,069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Lampiran 6. Hasil analisis statistik reaksi akrosom

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
reaksiakrosom * perlakuan	20	100,0%	0	0,0%	20	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

		reaksiakrosom	
P0	1	2	
	2	0	
	3	0	
	4	4	
	5	4	
	N	5	
	Mean	2,00	
	Total	Median	2,00
		Std. Error of Mean	,894
		Std. Deviation	2,000
perlakuan	1	4	
	2	6	
	3	2	
	4	2	
	5	4	
	N	5	
	Mean	3,60	
	Total	Median	4,00
		Std. Error of Mean	,748
		Std. Deviation	1,673
P2	1	6	
	2	6	
	3	4	
	4	6	

	5		6
		N	5
		Mean	5,60
	Total	Median	6,00
		Std. Error of Mean	,400
		Std. Deviation	,894
	1		4
	2		4
	3		2
	4		6
	5		4
P3		N	5
		Mean	4,00
	Total	Median	4,00
		Std. Error of Mean	,632
		Std. Deviation	1,414
		N	20
		Mean	3,80
Total		Median	4,00
		Std. Error of Mean	,433
		Std. Deviation	1,936

a. Limited to first 100 cases.

Oneway

Descriptives

reaksiakrosom

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					P0	5		
P1	5	3,60	1,673	,748	1,52	5,68	2	6
P2	5	5,60	,894	,400	4,49	6,71	4	6
P3	5	4,00	1,414	,632	2,24	5,76	2	6
Total	20	3,80	1,936	,433	2,89	4,71	0	6

Test of Homogeneity of Variances

reaksiakrosom

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,277	3	16	,316

ANOVA

reaksiakrosom

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32,800	3	10,933	4,556	,017
Within Groups	38,400	16	2,400		
Total	71,200	19			

Post Hoc Tests**Homogeneous Subsets**

reaksiakrosom

Duncan

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P0	5	2,00	
P1	5	3,60	3,60
P3	5	4,00	4,00
P2	5		5,60
Sig.		,070	,070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.