

SKRIPSI

REVIANY VIBRIANITA NIDOM

ANALISIS TOTAL RNA TESTIS MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI AIR *Justicia gendarussa* Burm.f. DENGAN METODE NORTHERN BLOT



FAKULTAS FARMASI
BAGIAN BAHAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

Lembar Pengesahan

**ANALISIS TOTAL RNA TESTIS MENCIT SETELAH
PEMBERIAN FRAKSI AIR *Justicia gendarussa* Burm.f.
DENGAN METODE NORTHERN BLOT**

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Oleh :

Reviany Vibriaanita Nidom
NIM : 050112361

Skripsi ini telah disetujui
Tanggal 12 Oktober 2005 oleh:

Pembimbing Utama

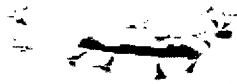
Dr. Bambang Prajogo Eko Wardoyo, drs., Apt., MS.
NIP. 131 470 993

Pembimbing Serta I

Dr. Garry Cores de Vries., drh., MS.
NIP. 130 678 556

Pembimbing Serta II

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto., MS.
NIP. 132 095 706



18

誰にでもまちがいはある
だからエンピツにも
消しごむがついている

Everyone makes mistakes. That's why there is an eraser on every pencil

百語より一笑

A smile is worth a thousand words

笑顔があれば
自分を変える
他人を変える
運命を変える

If you smile you can change yourself, others and your future

いつも笑顔で
いつも素直に

Always smiling, always honest and gentle

今日という日を
笑顔の輝念日
にしよう

Let's make today a stellar day

(Japanesse proverbs)



19

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, atas rahmat dan karuniaNya serta shalawat dan salam kepada Rasulullah SAW beserta keluarga dan sahabatnya sehingga skripsi ini dapat selesai dengan sebaik-baiknya.

Dengan selesainya skripsi berjudul “ANALISIS TOTAL-RNA TESTIS MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI AIR *Justicia gendarussa* Burm.f DENGAN METODE NORTHERN BLOT” ini, perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Bambang Prajogo E. W., MS.Apt sebagai pembimbing utama dan pimpinan “Proyek Gandarussa” yang selalu memberikan masukan, membimbing dan memberi dorongan baik moril dan materiil kepada saya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Dr.drh Garry Cores de Vries, MSc sebagai pembimbing serta I yang tulus ikhlas dan penuh kesabaran membimbing dan memberi dorongan moril dan materiil kepada saya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
3. Dr.Ir.Didik Pudji Restanto, MS sebagai pembimbing serta II sekaligus penguji yang tulus ikhlas dan penuh kesabaran membimbing dan memberi dorongan moril dan materiil kepada saya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
4. Dr.rer.nat. Mulya Hadi Sentosa selaku dosen penguji, yang telah banyak memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof. Dr.Noor Cholies Z. Atas kesempatan yang diberikan kepada saya mengikuti pendidikan program sarjana.
6. Drs.H.Harjana, MSc. Selaku dosen wali, atas semua bimbingan dan dukungan moril yang telah diberikan kepada saya selama menyelesaikan pendidikan sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Ketua Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember dan Direktur TDC universitas Airlangga serta ketua Laboratorium Hepatitis TDC UNAIR yang telah memberikan fasilitas laboratorium untuk menyelesaikan skripsi saya.

8. Para dosen yang telah mendidik dan mengajarkan ilmu pengetahuan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan sarjana serta seluruh staff bagian ilmu bahan alam yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Tak lupa saya ucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Kedua orang tua saya drh C.A.Nidom,MS dan Achmamiek Hariati yang dengan doa dan dukungannya serta bimbingannya akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi ini saya persembahkan untuk almarhum kakek saya H.M.Nidom yang tidak kesampaian melihat cucunya lulus sarjana, serta tidak lupa nenek saya Hj Sofiah yang selalu menasehati agar cepat menyelesaikan kuliah.
2. Mbak Sri Lestari Utami yang dengan sabar telah membimbing dan mendengarkan keluhan-keluhan saya serta sebagai teman diskusi yang paling TOP BGT. May Allah Bless you always.
3. Teman-teman “gandarusa team” yang berjuang bersama-sama dari awal sampai akhir (ganbatte ne). Seluruh teman-teman angkatan 2001 fakultas Farmasi UNAIR yang sama-sama berjibaku menimba ilmu di Framasi.
4. Andra Kusuma P. Terima kasih banyak buat dukungan dan doa-doanya selama ini.
5. Teman-taman dan para dosen di laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember yang banyak membantu dalam pengerjaan skripsi saya ini (terimakasih banyak), serta seluruh pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi saya yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu.

Tidak ada yang bisa saya berikan selain doa semoga Allah SWT membalas kebaikan anda semua dengan pahala yang berlipat ganda. Akhir kata skripsi ini masih banyak kekurangan, namun saya berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat demi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu farmasi, dan bermanfaat banyak bagi masyarakat.

Surabaya, September 2005

Penulis

RINGKASAN

ANALISIS TOTAL-RNA TESTIS MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI AIR *Justicia gendarussa* Burm.f DENGAN METODE NORTHERN-BLOT

Reviany Vibriaanita Nidom

Indonesia sebagai negara yang kaya akan tanaman obat ternyata memiliki tanaman yang berkhasiat sebagai kontrasepsi pria yaitu *Justicia gendarussa* burm.f. Menurut hasil laporan Moeso dan Agus dari perjalanan ke Sentani pada tahun 1985 ditemukan bahwa masyarakat pedalaman Papua menggunakan gandarusa untuk obat kontrasepsi pria dalam bentuk rebusan.

Syarat kontrasepsi ideal adalah berdaya guna, murah, estetik, mudah didapat, tidak memerlukan motivasi terus-menerus, efek sampingnya minimum dan aman. Aman dalam hal ini tidak toksik, tidak mutagenik dan tidak karsinogenik serta tidak teratogenik. Untuk menjadikan gandarusa sebagai alat kontrasepsi ideal perlu dilakukan penelitian-penelitian, salah satunya adalah dengan mendeteksi ada atau tidak perubahan rangkaian RNA akibat pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan menggunakan metode northern blot pada probe dengan panjang nukleotida 710 bp.

Keuntungan digunakan metode northern blot adalah dapat memberikan informasi secara simultan tentang spesies, ukuran dan ekspresi dari tingkat RNA-RNA yang berbeda yang tidak dapat dimunculkan oleh teknik lain. Disamping itu dapat digunakan untuk analisis transkripsi RNA-RNA dari beberapa gen dalam sampel RNA yang sama.

Metode penelitian ini menggunakan metode eksploratif yang akan menempuh beberapa tahap yaitu ekstraksi fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f sebagai bahan uji, persiapan hewan perlakuan dan tanpa perlakuan, pemberian bahan uji pada hewan perlakuan, isolasi total RNA dari sel-sel tubulus seminiferus testis dari hewan perlakuan dan tanpa perlakuan hingga pendeteksian RNA testis mencit dengan northern blot. Pada penelitian ini terdapat 6 kelompok yang akan diuji yaitu terdiri dari kelompok I diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan dosis 26,06 mg ($1/12$ LD₅₀); kelompok II diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan dosis 18,39 mg ($1/17$ LD₅₀); kelompok III diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan dosis 3,47 mg ($1/90$ LD₅₀); kelompok IV diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan dosis 3,13 mg ($1/100$ LD₅₀); kelompok V diberikan larutan hesperidin 0,2% sebagai kontrol (+) dan kelompok VI diberikan larutan CMC-NA 0,5% sebagai kontrol (-).

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa kelompok perlakuan I,II,III,IV dan VI menunjukkan adanya band pada negatif film hasil analisis dengan northern

blot sedangkan kelompok V, yaitu kontrol (+) tidak menunjukkan adanya band. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena kelebihan garam pada total RNA sampel sehingga *bandnya* berjalan cepat dan menjadi habis setelah proses *running* selesai atau karena adanya kontaminasi Rnase pada sampel tersebut atau dapat pula disebabkan karena terjadi mutasi pada rangkaian RNA dari testis yang diberi hesperidin. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan 4 macam dosis ($1/12$ LD₅₀; $1/17$ LD₅₀; $1/90$ LD₅₀ dan $1/100$ LD₅₀) serta kontrol (-) yang mengandung CMC-Na 0,5% tidak menyebabkan terjadinya perubahan rangkaian RNA pada testis mencit. Untuk penelitian lebih lanjut disarankan agar dilakukan pemeriksaan rangkaian basa nukleotida seluruh testis mencit yang telah diteliti, terutama kontrol (+), melalui metode sequencing sehingga dapat diketahui ada tidaknya perubahan rangkaian basa nukleotida.

ABSTRACT**ANALYSIS OF TOTAL RNA OF MICE TESTIS AFTER RECEIVING THE WATER FRACTION OF *Justicia gendarussa* Burm.f BY NORTHERN BLOT METHOD**

Justicia gendarussa Burm.f as a male contraception must be fulfill the requirements as an ideal contraception, one of it is non mutagenic. This study was a first step of a research serial that purpose to detect whether there is a change of total RNA series of mice testis or not after receiving water fraction of *Justicia gendarussa* Burm.f. In this research were used four doses of water fraction *Justicia gendarussa* Burm.f that were $1/12$ LD₅₀, $1/17$ LD₅₀, $1/90$ LD₅₀ and $1/100$ LD₅₀ which was gived to male mice for 55 days. Afterwards testis of them were analized by northern blot method using probe cDNA hyaluronidase around 710 bp in length. The results from 6 data (four data of doses, control (+) and control (-)) were obtained that all of the doses data and control (-) showed a single band while the control (+) there wasn't. This indicated that total RNA series of all the doses and control (-) was matched with probe and it can be concluded that the series of RNA of 4 doses and control (-) didn't show any change. Based on the findings, it should be necessary to do sequencing of RNA series all of the sample have change of nucleotide base series or not.

Key word : *Justicia gendarussa* Burm.f, total RNA, mice testis, northern blot method

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iv
RINGKASAN	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Tentang <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	4
2.1.1 Klasifikasi <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	4
2.1.2 Nama daerah	4
2.1.3 Morfologi tanaman	5
2.1.4 Kandungan tanaman	6
2.1.5 Kegunaan tanaman	6
2.2 Tinjauan Tentang Ekstraksi	6
2.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut	7
2.2.1.1 Cara dingin	7
2.2.1.1.1 Maserasi	7
2.2.1.1.2 Perkolasi	7
2.2.1.2 Cara panas	7
2.2.1.2.1 Refluks	7
2.2.1.2.2 Soxhlet	7
2.2.1.2.3 Digesti	8
2.2.1.2.4 Infus	8

2.2.1.2.5 Dekok	8
2.2.2 Destilasi uap	8
2.3 Tinjauan Tentang Testis	8
2.4 Tinjauan Tentang RNA	10
2.4.1 Mutasi	12
2.5 Tinjauan Tentang Northern Blotting	13
2.6 Tinjauan Tentang Elektroforesis	14
2.6.1 Metode elektroforesis	15
2.6.1.1 Elektroforesis gel poliakrilamid	15
2.6.1.2 SDS page	15
2.6.1.3 Elektroforesis gel agarose	15
2.7 Tinjauan Tentang Probe	16
2.8 Tinjauan tentang Spektrofotometer UV-Vis	17
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	18
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Kerangka Operasional	20
BAB IV MATERI DAN METODE PENELITIAN	21
4.1 Rancangan Penelitian	21
4.2 Bahan Penelitian	21
4.2.1 Bahan untuk pembuatan ekstrak	21
4.2.2 Bahan kimia	21
4.2.3 Hewan penelitian	22
4.3 Alat-alat Penelitian	22
4.4 Metode Penelitian	22
4.4.1 Pembuatan ekstrak	22
4.4.2 Pemberian bahan uji	23
4.4.3 Penentuan primer gen hyaluronidase spermatozoa	23
4.4.4 Proses isolasi total RNA testis mencit	23
4.4.5 Prosedur elektroforesis dengan gel agarose	24
4.4.6 Prosedur pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis...	24
4.4.7 Prosedur northern blot	25
BAB V HASIL PENELITIAN.....	28

BAB VI	PEMBAHASAN.....	32
BAB VII	KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN 1	38
LAMPIRAN 2	40
LAMPIRAN 3	41



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
V.1 Hasil Pengukuran Konsentrasi Total RNA.....	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f	5
2.2 6,8-di- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi flavon	6
2.3 6- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-8- β -D-silopiranosilflavon.....	6
2.4 Anatomi Testis	9
2.5 Struktur Penyusun RNA.....	12
2.6 Proses Northern Blotting	14
3.1 Bagan Alur Kerangka Konseptual	19
3.2 Bagan Kerangka Operasional Northern Blotting	20
4.1 Bagan Pembuatan Serbuk Kering Fraksi air <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.....	27
5.1 Hasil Elektroforesis Isolasi Total RNA	28
5.2 Grafik Spektrofotometer Konsentrasi Total RNA	30
5.3 Hasil Hibridisasi Northern Blot	31

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

RNA	: Ribonucleic Acid
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
tRNA	: Transfer Ribonucleic Acid
rRNA	: Ribosomal Ribonucleic Acid
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ATP	: Adenocin Tri Phosphat
A	: Adenin
C	: Cytosin
T	: Timin
G	: Guanin
U	: Urasil
cDNA	: Complemeter Deoxyribonucleic Acid
NaCl	: Natrium Cloride
°C	: Derajat Celsius
EtBr	: Ethidium Bromide
UV	: Ultra Violet
TE	: Tris-EDTA
EDTA	: Ethylene Diamine tetraacetic Acid
HCl	: Chloride acid
TBE	: Tris Boric acid - EDTA
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
MOPS	: 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid
µg	: Mikrogram
µl	: Mikroliter
BB	: Berat Badan
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
ml	: Mililiter
g	: Gram

nm	: Nanometer
%	: persen
λ	: Lambda
M	: Molar
rpm	: Rotation Per Minute
Volt	: Voltase
bp	: Base Pairs



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut hasil sensus penduduk di Indonesia diketahui bahwa selama 3 dasawarsa terakhir jumlah penduduk Indonesia terus meningkat dengan pesat, walaupun laju pertumbuhan penduduk menunjukkan kecenderungan menurun. Pada tahun 2003 jumlah penduduk Indonesia diperkirakan sekitar 215 juta jiwa dan menduduki peringkat ke-4 jumlah penduduk terbanyak di dunia.

Salah satu cara untuk menangani masalah kependudukan tersebut adalah melalui program Keluarga Berencana (KB). Selama ini peserta KB mayoritas adalah wanita karena banyaknya pilihan dari alat-alat kontrasepsi yang tersedia, sedangkan keikutsertaan pria sebagai akseptor KB masih sangat rendah karena keterbatasan jenis dari alat-alat kontrasepsi tersebut. Hal ini dapat dilihat dari data SDKI 2002/2003 yang memperlihatkan bahwa peserta KB pria (yang menggunakan metode kontrasepsi modern) hanya berjumlah 1,3%, terdiri dari kondom 0,9% dan MOP 0,4%, sedangkan jika ditambahkan metode lain yaitu pantang berkala dan senggama terputus maka kesertaan pria tersebut meningkat 4,4% (www.bkkbn.go.id), sehingga perlu dikembangkan kontrasepsi baru bagi pria agar terdapat banyak pilihan dalam penggunaan kontrasepsi.

Indonesia sebagai negara yang kaya akan tanaman obat ternyata memiliki tanaman yang dapat berkhasiat sebagai kontrasepsi pria. Menurut hasil laporan Moeso S. dan Agus P dari perjalanan ke Sentani pada tahun 1985 ditemukan bahwa masyarakat pedalaman Irian Jaya (Papua) menggunakan gendarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f) untuk obat kontrasepsi pria dalam bentuk rebusan, dengan cara meminum rebusan akar dan daunnya dua kali sebulan. Dengan adanya hasil laporan ini, menimbulkan banyaknya penelitian lebih lanjut mengenai tanaman tersebut.

Syarat kontrasepsi ideal adalah berdaya guna, murah, estetik, mudah didapat, tidak memerlukan motivasi terus-menerus, efek sampingnya minimum dan aman (Setianingsih,1998). Aman dalam hal ini tidak toksik, tidak

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas maka permasalahan yang timbul adalah:

Apakah *Justicia gendarussa* Burm.f dapat menimbulkan efek samping seperti mutasi pada RNA testis mencit ?

1.3 Tujuan Penelitian

Mendeteksi ada atau tidaknya perubahan pada rangkaian RNA akibat pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan metode Northern-blot pada probe tertentu.

1.4 Manfaat Penelitian

Mendukung penelitian dan pengembangan tanaman obat Indonesia dengan aspek baru dibidang antifertilitas, khususnya bidang antifertilitas pria, yang masih sedikit dilakukan dan dengan hasil penelitian ini dapat digunakan untuk melengkapi acuan penelitian sejenis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang *Justicia gendarussa* Burm.f

2.1.1 Klasifikasi *Justicia gendarussa* Burm.f

- Klasifikasi : (Steenis, 1978)
- Divisi : Spermatophyta
- Anak divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Anak kelas : Sympetalae
- Bangsa : Schopulariales
- Suku : Acanthaceae
- Marga : *Justicia*
- Jenis : *Justicia gendarussa* Burm.f.
- Sinonim : *Gendarussa vulgaris* Nees

Justicia dahona Buch

Justicia nigricans Lair

Justicia salicina Vahl

2.1.2. Nama daerah

- Sumatera : Besi-besi (Aceh)
Gandarussa (Melayu)
- Jawa : Handarussa (Sunda)
Gandarusa, Tetean, Trus (Jawa)
Gandarusa (Madura)
- Nusa Tenggara : Gandarisa (Bima)
- Maluku : Puli (Ternate)

(Steenis, 1978)

2.1.3 Morfologi tanaman

Setengah perdu tegak, sering bercabang banyak, 0,7-1,8 m tingginya. Batang segiempat tumpul atau cukup bulat, yang muda ungu, yang tua coklat muda. Tangkai daun 5-8 mm, helaian daun bentuk lanset, beringgit lebar dan tidak dalam, seperti kulit tipis, 6-20 kali 1,5-3,5 cm.

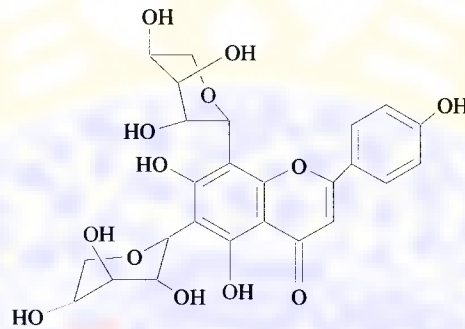
Bunga terkumpul dalam malai sangat sempit, 3-12 cm panjangnya, yang tersusun dari anak payung menggarpu yang rapat. Daun pelindung kecil, sempit, runcing dan boleh dikatakan sama. Mahkota gundul, tabung pucat, berbintik ungu. Pinggiran mahkota berbibir dua; bibir bawah bentuk baji hingga bulat telur terbalik, dengan 3 taju membalut pendek, putih, pada pangkal ungu, berbintik dan dengan lipatan miring; bibir atas segitiga, runcing, putih, berbintik ungu. Tangkai putik gundul, 6-10mm. Buah bentuk gada, gundul (Steenis, 1978).



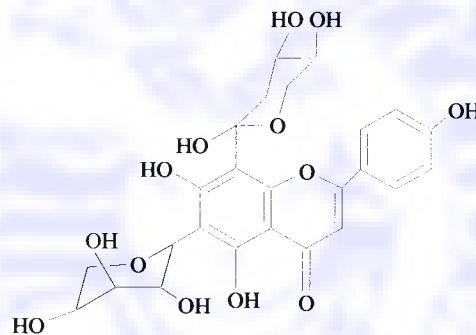
Gambar 2.1. Tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f

2.1.4 Kandungan tanaman

Tanaman gandarusa mengandung zat kimia kalium, flavonoid (6,8-diarabinosilapigenin dan 6-arabinosil-8-silosilapigenin) (prajogo, 2002); steroid, triterpen, tannin 0,4% (Materia Medika VI, 1996).



Gambar 2.2 6,8-di- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-flavon atau 6,8-diarabino-silopigenin (prajogo, 2002).



Gambar 2.3 6- α -L-arabinopiranosil-4',5,7-trihidroksi-8- β -D-silopiranosilflavon atau 6-arabinosil-8-silosilapigenin (Prajogo, 2002).

2.1.5 Kegunaan tanaman

Daun gandarusa digunakan dalam beberapa ramuan obat tradisional. Pada umumnya sebagai obat penahan nyeri. Daun-daun ditumbuk bersama cuka dan merica digunakan untuk mengobati sakit kepala dan dengan kapur sirih serta merica untuk mengobati encok (rheumatik). Air rebusan daun dapat mengeluarkan keringat dan menurunkan demam (Heyne, 1985).

Pemberian infuse daun gandarusa pada kadar tertentu dapat mempengaruhi efek antifertilitas spermatogenesis mencit (Ilham, 1992), serta dapat menurunkan kadar testosteron dalam serum tikus (Constantia, 1992). Di Papua, air rebusan akar dan daun gandarusa diminum oleh para suami dua kali dalam satu bulan sebagai obat kontrasepsi pria (Moeso dan Agus, 1985).

2.2. Tinjauan tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair.

2.2.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

2.2.1.1 Cara dingin

2.2.1.1.1 Maserasi

Adalah proses pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan.

2.2.1.1.2 Perkolasi

Adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (exhaustive extraction) yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.2.1.2 Cara panas

2.2.1.2.1 Refluks

Adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi yang sempurna.

2.2.1.2.2 Soxhlet

Adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.2.1.2.3 Digesti

Adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

2.2.1.2.4 Infus

Adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.2.1.2.5 Dekok

Adalah infus pada waktu yang lebih lama (30⁰C) dan temperatur sampai titik didih air.

2.2.2 Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri), dari bahan segar atau simplisia, dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian. Terdapat dua macam destilasi uap, pertama destilasi uap : bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi. Sedangkan yang kedua adalah destilasi uap dan air : bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinu ikut terdestilasi (Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, 2000).

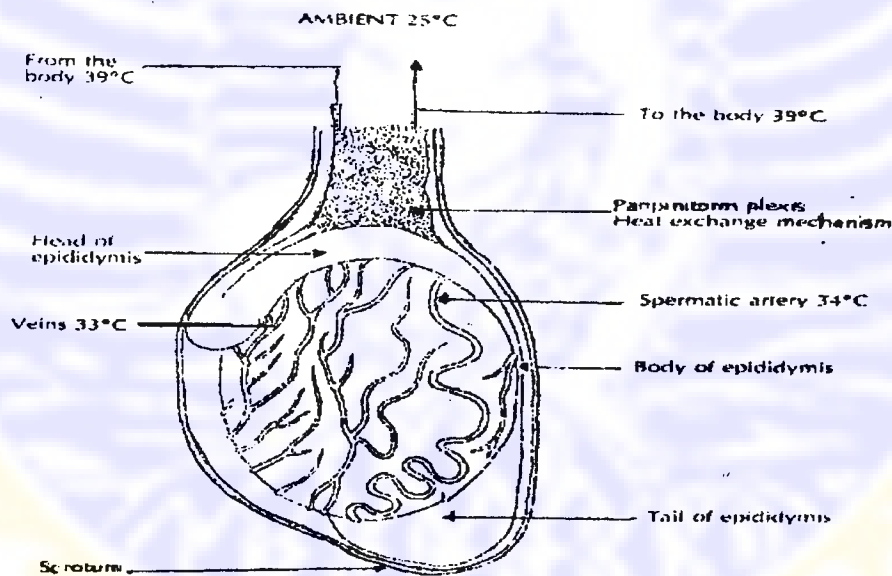
2.3 Tinjauan Tentang Testis

Komponen-komponen penting pada gonad jantan adalah tubulus seminiferus yang mensekresi sperma dan sel Leydig yang terdapat pada jaringan interstisial yang mensekresi androgen. Komponen-komponen tersebut terdapat dalam testis dari alat kelamin jantan.

Pada dasarnya fungsi testis ada dua, yaitu menghasilkan hormon seks jantan, disebut androgen, dan menghasilkan gamet jantan, disebut sperma.

Sperma dihasilkan di tubulus seminiferus yang merupakan lebih dari 90% massa testis. Tubulus-tubulus tersebut sangat berliku-liku, setiap testis mengandung tubulus-tubulus yang mencapai jarak bermil-mil bila direntangkan. Struktur histologi tubulus berubah secara cepat dengan bertambahnya umur. Pada jantan muda struktur tubulus lebih sederhana, epitelium lembaga hanya terdiri atas sel-sel spermatogonia dan sertoli. Pada jantan yang lebih tua, spermatogonia tumbuh menjadi spermatosit primer yang setelah pembelahan miosis pertama tumbuh menjadi spermatosit sekunder haploid.

Selanjutnya spermatosit sekunder haploid tumbuh menjadi spermatid, yang setelah mengalami sederetan transformasi disebut spermiogenesis, kemudian tumbuh menjadi sel sperma yang terdiri atas kepala, sebuah bagian tengah (tubuh), serta sebuah bagian ekor. Sel-sel sertoli yang ditemukan di sepanjang membrana basalis tubulus disebut "sel induk sperma", karena diperkirakan bahwa kepala sperma yang menempel pada sel sertoli mengalami pemasakan di dalam sel sertoli (Nalbandov, 1990).



Gambar 2.4 Anatomis Testis

2.3. Tinjauan Tentang RNA

RNA (Ribo Nucleic Acid) tersusun atas nukleotida yang mengandung gula ribose, sehingga penamaannya didasarkan atas kandungan gulanya ini. Selain itu pada RNA terdapat 4 nukleotida yang berbeda, yang masing-masing mengandung 4 basa yang berbeda yaitu A, U, C dan G. RNA yang terdiri atas untai tunggal (single stranded) dan banyak ditemukan di nukleus dan sitoplasma sel serta berfungsi membantu DNA yang akan ditranslasikan menjadi protein.

Beberapa jenis RNA yang terdapat dalam sel adalah :

1. mRNA (messenger RNA)

Suatu RNA yang akhirnya akan ditranslasikan menjadi polipeptida, dimana panjangnya akan mencerminkan panjang polipeptida yang disandinya.

2. rRNA (Ribosomal RNA)

RNA yang digunakan untuk membentuk ribosom (organel sel yang digunakan untuk mensintesis protein dengan mentranslasikan mRNA)

3. tRNA (transfer RNA)

Molekul RNA yang membawa asam amino pada polipeptida yang sedang terbentuk. Terdapat 32 jenis tRNA yang berbeda pada sel eukaryotik tertentu yang masing-masing merupakan hasil dari gen yang terpisah.

4. snRNA (small nuclear RNA)

RNA yang dibutuhkan pada tahap-tahap transkripsi DNA.

5. snoRNA (small nucleolar RNA)

RNA yang berada dalam nucleolus.

6. miRNA (microRNA)

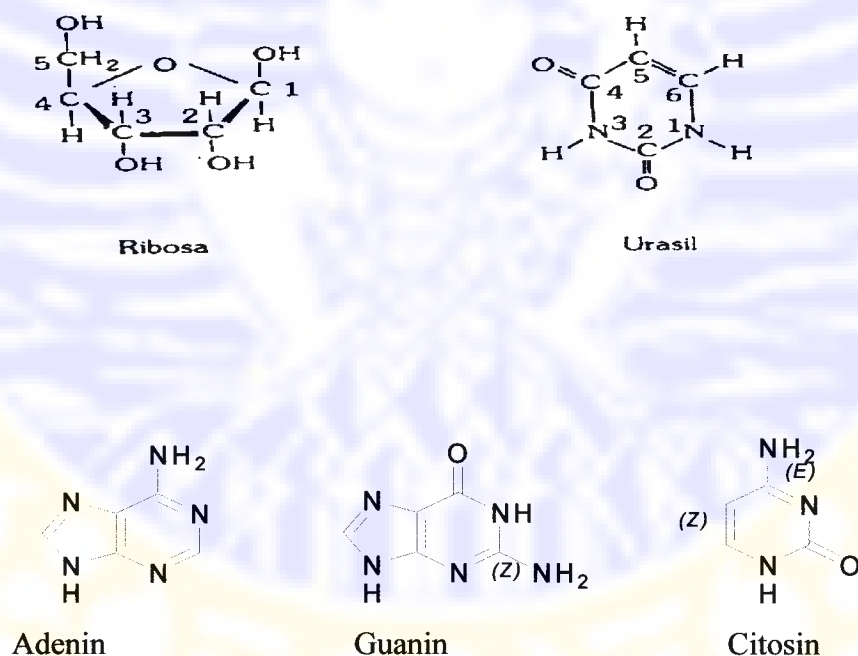
Molekul RNA yang kecil yang terlihat pada regulasi ekspresi dari molekul mRNA.

7. XIST RNA

Salah satu dari dua kromosom X yang tidak aktif pada vertebrata betina.

RNA disintesis pada DNA template dengan proses yang diketahui sebagai transkripsi DNA. Tahap-tahap yang terdapat pada proses transkripsi DNA adalah Sejumlah 50 protein faktor transkripsi (transcription factors) yang berbeda mengikat pada sisi promotor, biasanya pada sisi 5' dari gen yang ditranskripsikan. Kemudian suatu enzim yaitu RNA polymerase mengikat kompleks faktor

transkripsi. Keduanya akan bekerja bersama-sama untuk membuka untai heliks ganda DNA. Lalu RNA polymerase akan melanjutkan ke bawah pada satu sisi untai DNA pada arah $3' \rightarrow 5'$. Sejalan dengan RNA polymerase yang berjalan sepanjang untai DNA, maka terdapat penyusunan ribonukleotida (terdapat sebagai trifosfat seperti ATP) menjadi suatu untai RNA. Setiap ribonukleotida akan disisipkan ke dalam untai RNA yang bertambah panjang sesuai dengan aturan tertentu dalam pasangan basa. Untuk setiap C pada untai DNA, maka G akan disisipkan pada RNA, begitu pula sebaliknya. Perkecualian untuk basa Adenin (A) pada untai DNA tidak akan disisipkan T pada RNA namun akan disisipkan U (Urasil), karena pada RNA tidak terdapat Timin (T). Sintesis RNA berjalan pada arah $5' \rightarrow 3'$. Dua fosfat terminal juga akan bergeser seperti setiap nukelotida trifosfat yang ditambahkan pada ujung $3'$ dari untai yang bertambah panjang. Saat RNA polymerase bertemu dengan signal terminasi (rangkain nukleotida yang spesifik) maka hasil transkripsi akan dilepas dari DNA. Terdapat berbagai signal terminasi yang berbeda yang digunakan pada genom (Kimball, 2004).



Gambar 2.5 Struktur penyusun RNA

2.4.1 Mutasi

Mutasi merupakan perubahan pada rangkaian DNA yang mempengaruhi fenotip mutan (suatu organisme atau suatu gen yang berbeda dari jenis yang normal atau *wild type*). Perubahan yang sering terjadi pada mutasi adalah substitusi, penambahan atau delesi dari satu atau lebih basa. Terjadinya mutasi disebabkan oleh agen kimia atau fisik yang disebut mutagen. Sedangkan mutagenesis merupakan proses yang menghasilkan mutasi. Jika mutasi terjadi di alam dan tanpa penambahan suatu mutagen disebut mutagenesis spontan dan akan menghasilkan mutan spontan. Tetapi jika digunakan mutagen maka prosesnya disebut mutagenesis terinduksi (Freifalder dan Malacinski, 1993).

Beberapa jenis dari mutasi, diantaranya adalah :

1. Mutasi titik (*point mutation*), mutasi yang terjadi berdasarkan perubahan jumlah pasangan basa, dimana hanya satu pasangan basa yang berubah. Mutasi titik dapat berupa substitusi (penggantian), insersi (penyisipan) atau delesi (pengurangan) basa.
2. Mutasi "missense", yaitu jika mempengaruhi asam amino sebagai konsekuensi dari perubahannya, seperti substitusi asam amino.
3. Mutasi ts (*temperature-sensitive mutation*), jika substitusi akan menghasilkan protein yang aktif pada suatu suhu (khususnya 30°C) dan inaktif pada suhu yang tinggi (biasanya 40-42°C).
4. Mutasi nonsense atau mutasi *chain termination*, jika mutasi menghasilkan suatu kodon "stop", sehingga sintesis protein juga akan berhenti.

2.5 Tinjauan Tentang Northern Blotting

Untuk memeriksa rangkaian asam amino dan protein dapat dilakukan berdasarkan hibridisasi molekuler dari kedua asam nukleat. Dibawah kondisi temperatur dan konsentrasi ion seperti yang didapatkan pada sel maka struktur DNA akan tetap sebagai dupleks (untai ganda-double heliks), karena banyaknya ikatan hidrogen dari pasangan basa A-T dan G-C. Dupleks dapat didenaturasi menjadi untai tunggal dengan memanaskannya (biasanya pada larutan garam cair seperti 0,01M NaCl) atau menaikkan pHnya hingga diatas 11. Jika suhu diturunkan maka untai ganda akan menyatu kembali untuk membentuk dupleks

seperti semula (jika konsentrasi larutan cukup besar). Pada suatu campuran asam nukleat maka hanya untai yang komplementerlah yang akan menyatu kembali. Tingkat penyatuan ini kelihatannya tidak dipengaruhi oleh keberadaan untai-untai yang non komplementer. Hibridisasi molekuler ini dapat terjadi antara untai-untai yang komplementer baik dari DNA maupun RNA atau diantara suatu untai RNA dan DNA.

Hibridisasi molekuler tersebut merupakan prinsip blotting. Blotting adalah teknik biokimia yang secara luas digunakan untuk mendeteksi keberadaan makromolekul yang spesifik (protein, rangkaian atau fragmen mRNA/RNA lain dan DNA) pada suatu campuran. Terdapat 3 jenis proses blotting yang berbeda, yaitu :

1. Northern blotting / hibridisasi northern blot, dimana mRNA/RNA lain akan dideteksi dengan cDNA atau RNA pasangannya (menggunakan probe DNA atau RNA yang sudah dilabel), sehingga akan terjadi Hibridisasi DNA-RNA atau RNA-RNA.
2. Southern blotting / hibridisasi southern blot, dimana fragmen restriksi DNA dideteksi dengan rangkaian nukleotida komplementernya (menggunakan probe DNA yang sudah dilabel), sehingga terjadi Hibridisasi DNA-RNA.
3. Western Blotting/hibridisasi western blot/immunoblotting, dimana protein akan dideteksi dengan antibodi yang spesifik sebagai probenya sehingga terjadi hibridisasi protein-antibodi yang spesifik.

Northern blotting merupakan suatu prosedur dimana molekul-molekul RNA yang berbeda ukurannya terpisah dalam gel agarosa akan diimmobilisasi kedalam suatu solid support (penyangga padat) baik berupa membran nilon atau nitroselulosa, kemudian dilakukan hibridisasi dengan suatu probe DNA atau RNA yang telah dilabel. Akibatnya northern blotting akan mengarah pada hibridisasi RNA-DNA atau RNA-RNA. Teknik northern blotting adalah teknik yang paling mendasar dan berdaya guna yang akan digunakan dalam analisis ekspresi gen. Selain itu northern blotting merupakan suatu metode kuantitatif, sensitif dan dapat diandalkan (Wu *et.al.*,1997).

2.6.1 Metode elektroforesis

Perbedaan antara berbagai metode adalah tipe media pendukung, yaitu selulosa atau gel tipis. Selulosa digunakan sebagai media pendukung untuk senyawa biokimia yang mempunyai berat molekul kecil, misalnya asam amino dan karbohidrat. Sedangkan poliakrilamid dan gel agarosa digunakan sebagai media pendukung senyawa dengan berat molekul besar.

2.6.1.1 Elektroforesis gel poliakrilamid

Gel dibuat dari polimerisasi akrilamid. Keuntungan elektroforesis ini adalah mempunyai kemampuan untuk memisahkan protein dan asam nukleat yang berukuran kecil dan yang relatif besar, interaksi antara molekul yang bermigrasi dengan matriks relatif kecil dan stabilitas fisik matriks.

Kemampuan untuk memisahkan dan range ukuran molekul gel tergantung konsentrasi akrilamid dan bis akrilamid. Konsentrasi rendah akan membentuk pori yang besar dan digunakan untuk analisis senyawa dengan berat molekul yang besar. Dan sebaliknya, konsentrasi yang tinggi akan membentuk pori yang kecil dan digunakan untuk analisis senyawa dengan berat molekul yang kecil.

2.6.1.2 SDS page

Teknik elektroforesis ini tidak dipakai untuk mengukur berat molekul dari senyawa biologi. Mobilitas elektroforesis dari kompleks SDS – Protein dipengaruhi oleh ukuran molekul. Molekul yang besar diperlambat oleh saringan molekuler yang mempengaruhi gel dan molekul kecil mempunyai mobilitas yang lebih baik.

2.6.1.3 Elektroforesis gel agarosa

Teknik elektroforesis ini dipakai untuk analisis protein dan fragmen kecil asam nukleat. Ukuran pori gel yang kecil tidak digunakan untuk analisis fragmen asam nukleat yang besar atau molekul DNA yang utuh. Metode standar yang dipakai untuk karakterisasi RNA dan DNA yang mempunyai 200 – 50.000 pasangan basa adalah elektroforesis dengan agarose sebagai medium pendukung.

Agarosa, merupakan produk yang diekstraksi dari biji, adalah polimer linier dari turunan galaktopiranos. Gel dengan konsentrasi agarosa kurang dari 0,5 % mudah rapuh sehingga analisis sebaiknya digunakan horizontal. Sampel

yang akan dianalisis diletakkan pada tempat sampel dengan comb dan pada voltage yang sesuai sampai pemisahan sempurna.

Setelah analisa, asam nukleat dapat dilihat pada papan gel dengan merendam gel pada larutan Ethidium bromida, yaitu zat warna fluorescent. Dengan metode ini dapat dilakukan monitoring asam nukleat selama elektroforesis. Radiasi EtBr dengan lampu UV menghasilkan band merah – orange yang menunjukkan adanya asam nukleat.

Mobilitas asam nukleat pada gel agarosa dipengaruhi oleh konsentrasi agarose, ukuran molekul dan konformasi molekul asam nukleat. Konsentrasi agarosa 0,3 – 2 % paling efektif untuk separasi asam nukleat.

2.7 Tinjauan Tentang Probe

DNA probe atau cDNA probe merupakan molekul DNA untai tunggal yang dipakai sebagai indikator pada suatu proses hibridisasi. Panjang molekul tersebut antara 15 hingga ribuan nukleotida. DNA yang dibutuhkan untuk pembuatan probe ini harus berupa sebuah fragmen DNA untai tunggal murni yang mempunyai urutan bersifat komplementer dengan rangkaian asam nukleat (DNA atau RNA) yang ingin diketahui. DNA itu dapat diperoleh dengan cara kloning, atau bila rangkaiannya pendek, DNA dapat disintesis secara kimiawi.

Reaksi-reaksi hibridisasi yang menggunakan DNA probe sedemikian peka dan selektif sehingga meskipun rangkaian-rangkaian yang komplementer yang ada mempunyai konsentrasi yang rendah, sampai satu molekul persel misalnya rangkaian tersebut tetap dapat dideteksi. (Alberts *et.al.*, 1994)

Langkah-langkah yang dilakukan untuk mendapatkan probe yang diinginkan adalah pertama *alignment* fragmen cDNA yang diinginkan dengan cara mencocokkan beberapa rangkaian DNA dari setiap hewan mamalia, yang hampir serupa dengan rangkaian DNA mencit. Setelah didapatkan rangkaian DNA yang diinginkan maka rangkaian tersebut dapat dijadikan suatu primer *forward* dan *reverse*. Pengisolasian total RNA dari testis mencit normal, hasil dari total RNA ini nantinya akan dipakai sebagai RNA template yang akan digunakan untuk RT-PCR. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi total RNA yang didapat, lalu total RNA ini bersama-sama dengan primer *forward* dan primer *reverse* di RT-

PCR sesuai dengan waktu dan suhu yang telah dioptimasi. Setelah proses RT-PCR selesai maka fragmen cDNA yang dihasilkan akan disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotidanya dengan *DNA Sequencer ABI Prism 310*, sehingga pada akhirnya akan diperoleh keyakinan bahwa cDNA yang didapatkan mempunyai urutan basa nukleotida yang diinginkan (Utami, 2005).

2.8 Tinjauan Tentang Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis menggunakan dua daerah pengukuran yaitu daerah radiasi ultra lembayung (ultra violet) dengan λ 200-380 nm dan daerah radiasi sinar tampak (visibel) dengan λ 380-780 nm. Spektrum UV-Vis disebut juga spektrum elektronik karena merupakan hasil interaksi radiasi UV-Vis terhadap molekul yang mengakibatkan molekul tersebut mengalami transisi elektronik (Mulya dan Syahrani, 1990). Spektrofotometer UV-Vis sangat berguna untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Mulya dan Syahrani, 1990), untuk pengukuran RNA digunakan panjang gelombang (λ) maksimum 260 nm (Buchanan *et.al*, 2000) sedangkan untuk mengetahui kemurnian RNA dapat dilakukan pebandingan pengamatan pada λ 260 nm dan 280 nm dengan hasil antara 1,5-1,8 (Turner *et.al*, 2000).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Kerangka Konseptual

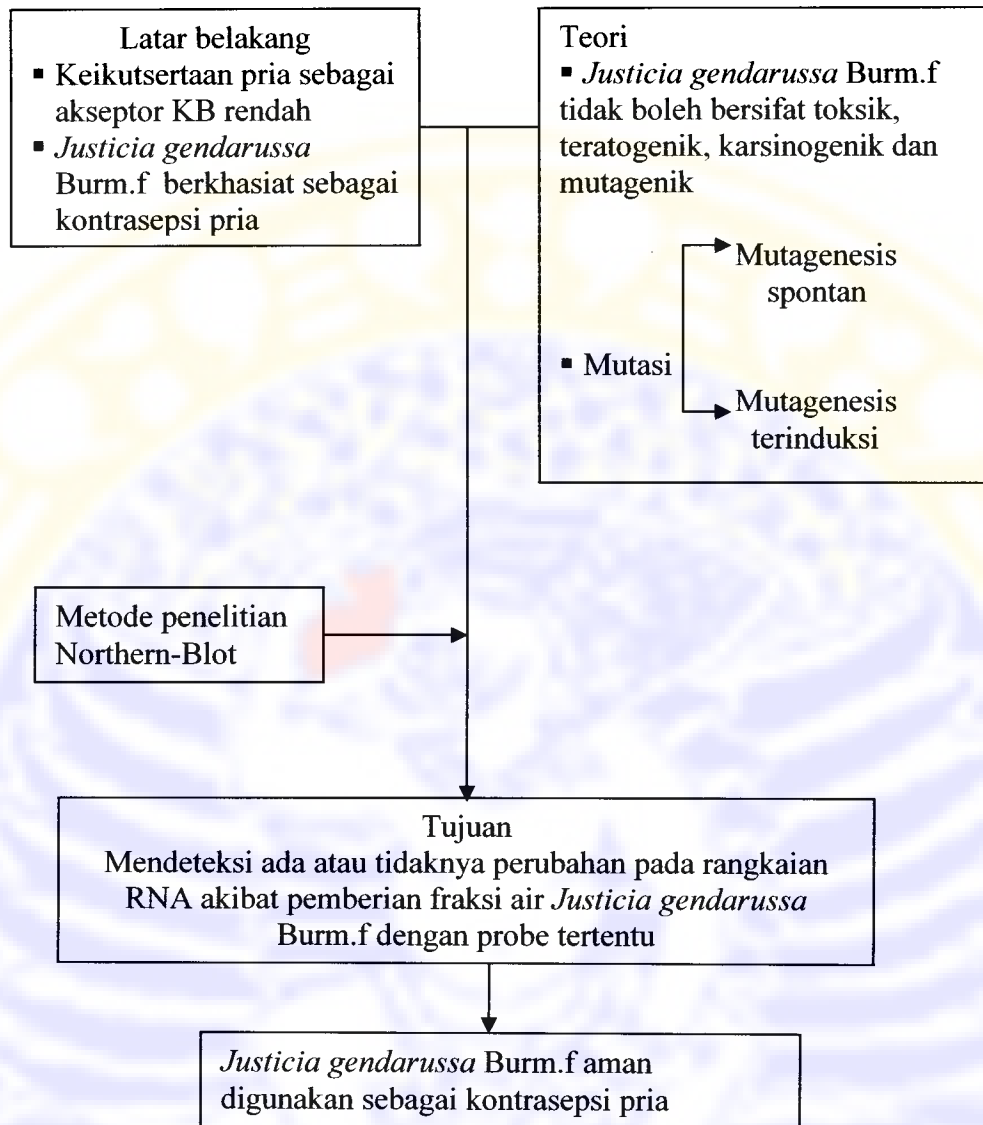
Salah satu cara untuk menangani masalah peningkatan jumlah penduduk dan laju pertumbuhannya adalah melalui program Keluarga Berencana (KB). Selama ini keikutsertaan pria sebagai aseptor KB masih sangat rendah karena keterbatasan dari alat-alat kontrasepsi tersebut sehingga diperlukan kontrasepsi baru bagi pria agar terdapat banyak pilihan dalam penggunaannya.

Justicia gendararussa Burm.f merupakan salah satu tanaman obat, yang melalui beberapa penelitian, dapat digunakan sebagai kontrasepsi pria. Kontrasepsi yang ideal adalah berdaya guna, murah estetik, mudah didapat, efek sampingnya minimum dan aman. Aman dalam hal ini adalah tidak toksik, tidak mutagenik, teratogenik dan karsinogenik.

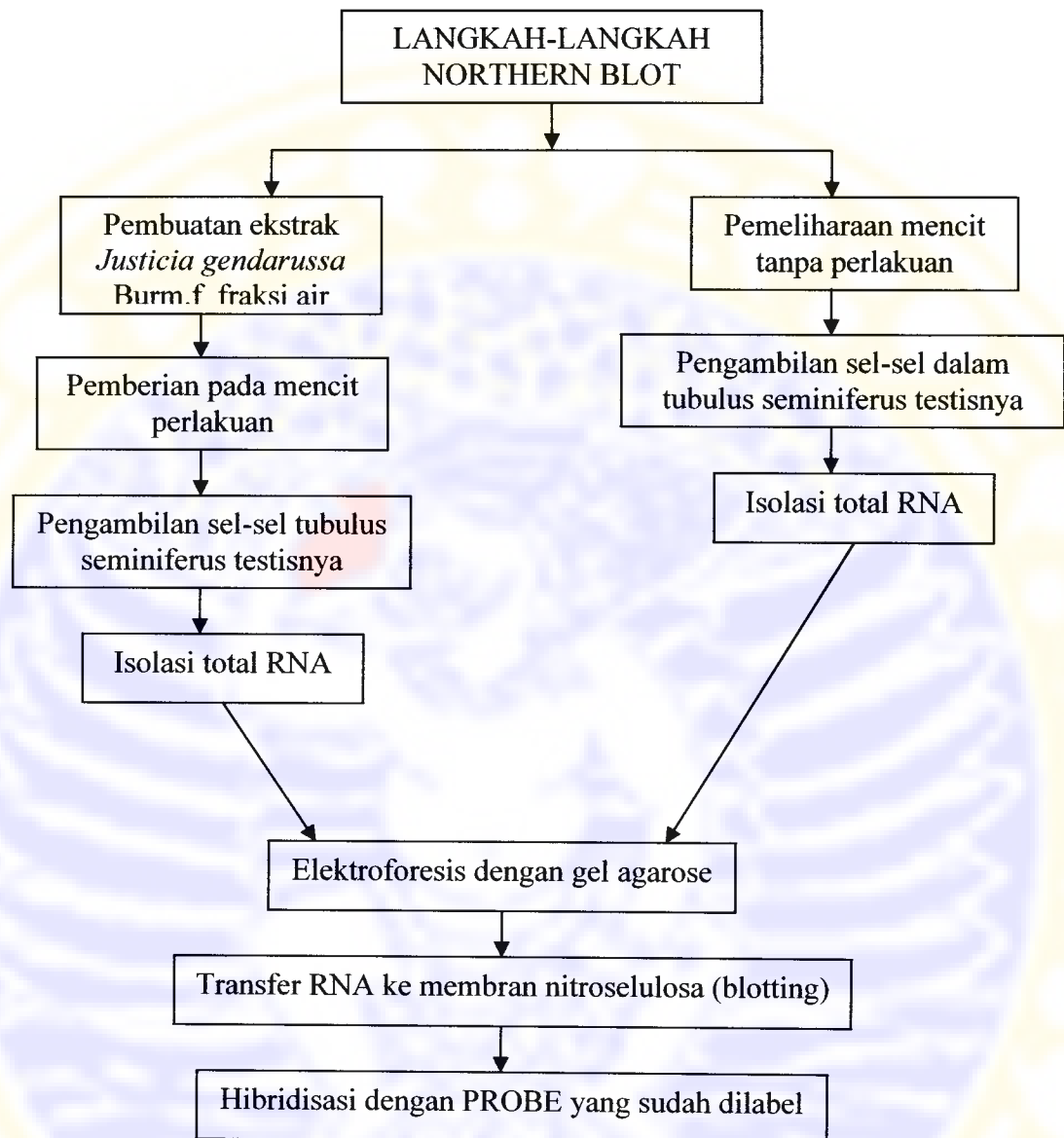
Terjadinya mutasi disebabkan oleh agen kimia atau fisik yang disebut mutagen. Jika mutasi terjadi di alam dan tanpa penambahan suatu mutagen disebut dengan mutagenesis spontan dan akan menghasilkan mutan spontan. Tetapi jika digunakan mutagen maka prosesnya disebut mutagenesis terinduksi.

Terdapat banyak cara yang dapat dilakukan untuk melihat apakah ada perubahan pada rangkaian RNA dalam mengekspresikan suatu gen sebagai awal pendugaan adanya mutasi. Diantaranya adalah Northern Blot. Teknik Northern-Blot adalah teknik mendasar dan berdaya guna yang digunakan dalam analisis ekspresi gen yaitu RNAny. Disamping itu juga merupakan suatu metode kuantitatif, sensitif dan dapat diandalkan (Wu *et.al*, 1997).

Kontrasepsi yang aman adalah yang bukan mutagen, sehingga perlu dianalisis apakah ada perubahan pada rangkaian RNA testis mencit setelah pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. Salah satu cara untuk mendeteksi hal tersebut dilakukan dengan metode Northern-Blot. Ini merupakan studi awal dari serangkaian studi yang berkelanjutan karena probe yang digunakan sebagai detektornya hanya pada rangkaian tertentu.



Gambar 3.1 Bagan Alur Kerangka Konseptual

Kerangka Operasional**Gambar 3.2** Bagan Kerangka Operasional Northern Blotting

B AB IV

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini menggunakan metode eksploratif yang akan menempuh beberapa tahap, pertama adalah ekstraksi fraksi air daun *Justicia gendarussa* Burm.f, sebagai bahan uji. Kemudian dilanjutkan dengan pendeteksian RNA testis mencit dengan Northern-blot, yang terdiri atas: persiapan hewan perlakuan dan tanpa perlakuan, pemberian bahan uji pada hewan perlakuan, isolasi total RNA dari sel-sel dalam tubulus seminiferus testis dari hewan perlakuan dan tanpa perlakuan, dan uji Northern-Blot dari hewan perlakuan.

4.2 Bahan Penelitian

4.2.1 Bahan untuk pembuatan ekstrak

Bahan sampel berupa daun yang dikumpulkan dari tanaman yang tumbuh di wilayah Trawas Mojokerto. Asal tanaman sebelumnya diidentifikasi di Laboratorium Botani farmasi-Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan digiling dengan alat penggiling.

4.2.2 Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel total RNA, bubuk agarosa 100 g, film polaroid, cDNA spesifik sebagai suatu probe, membran NC-1 (5 x 15 cm) 5 lembar, TrizolTM, aquadest steril, kloroform, 2-propanol, etanol 70%, sodium asetat, TE (pH7,6), Tris-CL, sodium lauryl sarcosinate, Northern blot kit, substrat chemiluminescent.

4.2.3 Hewan penelitian

Dalam penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur balb C, umur 2-3 bulan, dengan berat badan antara 20-30 gram dan sehat, yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya.

4.3 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cold sentrifuge, mikropipet dengan ukuran 0-10 μ l, 0-200 μ l dan 0-1000 μ l; pipet-pipet ujung yang steril, penampakan untuk memasukkan gel, sisir atau sikat gel dan suplai tenaga DC, alat elektroforesis, membran nitroselulosa, filter whatman 3 mm, kertas blotting, oven atau pengocok hibridisasi, waterbath dengan suhu yang dapat dikontrol, tabung appendorf.

4.4. Metode Penelitian

4.4.1 Pembuatan ekstrak

Bagian tanaman *Justicia gendarussa* Burm.f, yaitu bagian daun, disortasi basah agar terpisah dari kotoran-kotoran yang melekat kemudian dicuci hingga bersih. Setelah itu dilakukan perajangan dan pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena sinar matahari langsung sampai kering. Setelah itu disortasi kering kemudian diserbuk.

Serbuk daun *Justicia gendarussa* Burm.f diekstraksi dengan pelarut heksan secara maserasi hingga seluruh klorofil dan lemak yang terdapat dalam daun tersebut habis, terekstraksi ke dalam heksan. Serbuk tanaman gandarusa dikeringkan sampai kering untuk kemudian diekstraksi kembali dengan pelarut etanol 60%. Ekstrak etanol yang didapat diuapkan sampai kental dalam rotavapour kemudian dikeringkan pada lemari asam.

Ekstrak kering yang telah didapat tersebut diasamkan dengan HCL 2N sampai pH 3-4, kemudian dikocok dengan kloroform. Fasa air dan fasa kloroform akan dipisahkan. Fasa air yang didapat kemudian dibasakan dengan NH_4OH 25% hingga pH 9-10. setelah itu dikocok lagi dengan kloroform dan fasa airnya kembali dipisahkan dengan fasa kloroform. Fasa air yang didapat ini kemudian akan digunakan sebagai bahan uji.

4.4.2 Pemberian bahan uji

Bahan uji berupa fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f akan diberikan kepada hewan perlakuan yaitu mencit jantan dengan dosis dalam mg/g berat badan mencit. Lama pemberian disesuaikan dengan 1,5 kali siklus spermatogenesis mencit (55 hari) satu kali sehari peroral. Setiap perlakuan terdiri dari 5 kelompok dengan perlakuan yang berbeda, yaitu :

Kelompok I : diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. 26,06 mg

Kelompok II : diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. 18,39 mg

Kelompok III : diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. 3,47 mg

Kelompok IV : diberikan fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f. 3,13 mg

Kelompok V : diberikan larutan hesperidin 0,2%, sebagai kelompok kontrol positif.

Kelompok VI : diberikan larutan CMC Na 0,5% dalam aquadest, sebagai kelompok kontrol negatif.

4.4.3 Penentuan primer gen hyaluronidase spermatozoa

Primer yang digunakan adalah primer *forward* dan *reverse*. Primer ini merupakan rangkaian nukleotida tertentu dari homologi beberapa rangkaian mRNA gen hyaluronidase testis yang *dialignmentkan* dengan program *Genetic Mark* dari Mcintosh.

Primer *forward* : GCT TAG CTA TCA TTG ACT GG

Primer *reverse* : GCA CAT TTT GGC TGC TAG GG

4.4.4 Proses isolasi total RNA testis mencit

Setelah diberi perlakuan selama 55 hari maka testis mencit siap untuk diambil dan diisolasi untuk mendapatkan total RNA-nya dengan metode yang menggunakan larutan Trizol™ (yang mengandung Guanidium Isothiosianat dan fenol).

Testis mencit perlakuan digerus sehingga siap untuk diekstraksi. Testis yang sudah digerus dimasukkan dalam tabung appendorf dan ditambahkan kedalamnya 240µl aquadest steril sedikit demi sedikit. Setelah homogen ditambahkan kedalamnya 750µl larutan Trizol™, secara *pipetting*. Kemudian

campuran tersebut dipusingkan (vortex). Inkubasi campuran tersebut selama 5 menit pada suhu ruangan. Setelah proses inkubasi selesai, tambahkan 200 μ l kloroform lalu vortex. Diamkan campuran tersebut selama 5 menit pada suhu ruang. Kemudian sentrifuse 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Pindahkan 500 μ l supernatan (lapisan atas dari campuran tersebut) kedalam appendorf baru. Pada larutan supernatan dalam appendorf, ditambahkan 500 μ l 2-propanol kemudian divortex dan dibiarkan selama 10 menit pada suhu ruangan. Setelah 10 menit, sentrifuse larutan tersebut dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lalu supernatan dibuang secara perlahan-lahan dengan pipet. Pellet dicuci dengan etanol 70%, divortex dan disentrifuse pada suhu 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Buang supernatan dan keringkan pellet dengan pompa vakum selama \pm 10 menit, setelah itu larutkan pellet dengan 15 μ l TE dan total RNA siap untuk digunakan.

4.4.5 Prosedur elektroforesis dengan gel agarose

Hal yang pertama dilakukan adalah menyiapkan agarose gel 1% (dengan dapar TBE 1X). Setelah itu aplikasikan masing-masing sampel 2 μ l dan 1 μ l loading dye. Kemudian jalankan elektroforesis 20 menit pada 100 volt. Baca hasil elektroforesis setelah 20 menit dibawah transilluminasi UV.

4.4.6 Prosedur pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis

Ambil 1 μ l sampel dan diencerkan dengan aquadest steril sebanyak 1 ml. Untuk blanko digunakan aquadest steril. Masukkan sampel dalam kuvet dan lakukan pengukuran dengan spektrofotometri pada λ 300-200 nm dengan selisih rentang pengukuran 10 nm.

4.4.7 Prosedur northern blot

Prosedur kerja dari Northern-Blot akan dilakukan sesuai dengan metode dalam Sambrook *et al.* (1989). Prosedur pelabelan akan digunakan *Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II* sedangkan probe yang digunakan adalah probe pada daerah 710 bp.

Total RNA yang telah *dirunning*, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang (λ) 260-280 nm. Lalu membuat 220 ml gel agarose 1,2%. Kemudian gel agarose tersebut dimasukkan dalam Erlenmeyer yang sudah diberi stirrer dan di autoklaf. Setelah itu dinginkan gel agarose tersebut pada suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$ atau ditempatkan dalam waterbath. Tambahkan kedalam gel 39,27 ml formaldehid dan dikocok perlahan-lahan lalu masukkan gel tersebut kedalam gel tray dengan comb, biarkan dingin dan mengeras (± 30 menit) dan setelah mengeras ambil gel comb. Rendam gel agarose dalam buffer 1x MOPS. *Running* RNA sampel pada gel agarose yang telah dibuat dengan jumlah volume total RNA ditambah aquabidest steril per *wells* adalah 10 μl . Total RNA dan aquabidest yang telah dicampur dalam tabung appendorf dimasukan dalam waterbath dengan suhu 65°C selama 5 menit. Setelah 5 menit segera masukkan appendorf tersebut kedalam es dan tambahkan kedalam tiap-tiap appendorf loading dye sebanyak 40 μl sehingga volume akhir tiap *wells* adalah 50 μl . Campur loading dye dengan total RNA dan aquabidest steril dengan cara *pipetting*, kemudian diflash dan dimasukkan kedalam *wells* satu persatu. Lalu ujung atas sebelah kanan dari gel dipotong. Gel kemudian *dirunning* dengan dialiri listrik 20 Volt selama *overnight*, dimana warna biru pada gel yang berjalan.

Setelah proses *running* selesai, gel diambil kemudian dipotong sesuai dengan batas *wells* dan ditempatkan diatas kaca yang telah dialasi oleh kertas Whatman dan dibawahnya telah diberi suatu tempat. Lalu diatas gel diletakkan membran nitroselulose seukuran dengan membran. Kemudian ditutup dengan kertas Whatman seukuran dengan gel tersebut dan ditambahkan kertas mika yang telah dilubangi tengahnya, dimasukkan hingga dasar. Setelah itu kertas Whatman tersebut ditumpuk lagi dengan tisu hingga tinggi dan ditumpuk dengan buku serta pemberat (500g). Biarkan selama *overnight*. Membran yang telah tertransfer RNA dimasukkan dalam suatu kantong plastic untuk diberi larutan prehibridisasi dan hibridisasi, dan ditutup rapat. Lalu *dishaker* pada suhu 42°C selama *overnight*. Setelah itu membran dicuci selama 2x5 menit dengan stringency wash I pada suhu $15-25^{\circ}\text{C}$ dengan kocokan yang konstan. Kemudian dilanjutkan dengan pencucian membran menggunakan stringency wash II selama 2x15 menit pada suhu 65°C dengan kocokan konstan.

BAB V

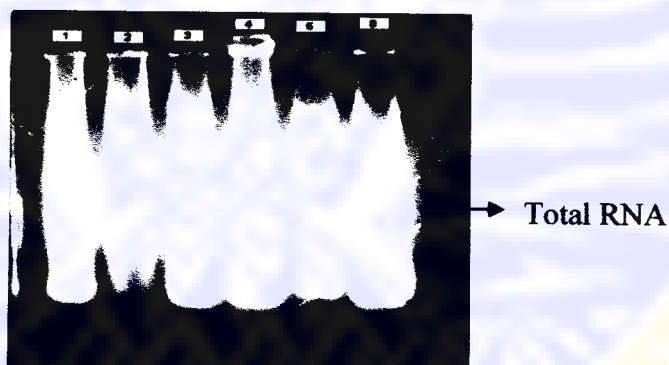
HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Ekstrak

Daun *Justicia gendarussa* Burm.f yang telah dikeringkan, kemudian dijadikan serbuk dan diekstraksi sehingga nantinya akan menghasilkan fraksi air gendarussa. Jumlah serbuk *Justicia gendarussa* Burm.f yang didapatkan : 7,75 kg, jumlah ekstrak fraksi etanol 60% *Justicia gendarussa* Burm.f : 175,1 g dan volume akhir fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f : 660 ml.

5.2 Hasil Isolasi Total RNA

Pada penelitian ini pengerjaan isolasi total RNA dilakukan dengan menggunakan metode larutan Trizol™ karena sangat singkat dan dapat digunakan untuk sampel yang banyak. Untuk mengetahui keberhasilan dalam isolasi total RNA tersebut, maka hasil isolasi total RNA diperiksa memakai elektroforesis dengan ditambahkan etidium bromida sebagai zat warna fluorescein. Setelah dilakukan elektroforesis didapatkan hasil seperti yang tertera pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis Isolasi Total RNA.

Keterangan gambar : lajur 1: dosis $1/12$ LD₅₀; lajur 2: dosis $1/17$ LD₅₀; lajur 3: dosis $1/90$ LD₅₀; lajur 4: dosis $1/100$ LD₅₀; lajur 5: kontrol positif dan lajur 6 :kontrol negatif.

Dari Gambar 5.1 dapat dilihat bahwa hasil elektroforesis dari isolasi total RNA menunjukkan adanya kandungan RNA, diantaranya rRNA, tRNA dan

mRNA, yang nantinya akan digunakan dalam northern blotting. Sebagian besar molekul-molekul RNA ini merupakan molekul yang relatif stabil dan dengan mudah dapat dideteksi menggunakan gel elektroforesis dan ethidium bromida untuk pewarnaan.

5.3 Hasil Pengukuran Konsentrasi Total RNA

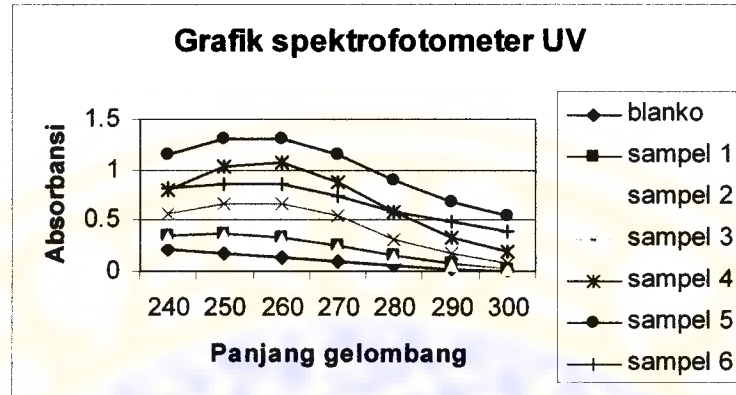
Untuk mengetahui konsentrasi total RNA yang didapat pada proses isolasi total RNA ini, dilakukan pengukuran konsentrasi total RNA dengan menggunakan spektrofotometer UV dengan rentang panjang gelombang 240-300nm. Hasil dari pengukuran konsentrasi total RNA dapat dilihat pada Tabel V.1

Tabel V.1 Hasil pengukuran konsentrasi total RNA

Sampel	Absorbansi ($\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$)	Konsentrasi RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Konsentrasi RNA dalam 15 μl TE ($\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$)
Blangko	0,139	-	-
1 ($1/12 \text{ LD}_{50}$)	0,333	7,76	116,40
2 ($1/17 \text{ LD}_{50}$)	0,314	7,00	105,00
3 ($1/90 \text{ LD}_{50}$)	0,669	21,20	318,00
4 ($1/100 \text{ LD}_{50}$)	1,080	37,64	564,60
C(+)	1,314	47,00	705,00
C(-)	0,852	28,52	427,80

Pada Tabel V.1 dapat dilihat bahwa konsentrasi RNA yang terbesar pada panjang gelombang maksimal (λ_{maks}) 260 nm adalah pada sampel kontrol positif (C(+)) dan secara keseluruhan konsentrasi total RNA yang didapatkan cukup besar. Cara perhitungan konsentrasi total RNA yang didapat secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 2.

Sementara itu grafik hasil spektrofotometer UV dari isolasi total RNA testis mencit perlakuan, kontrol negatif dan kontrol positif yang diukur absorbansinya pada λ 240-300 nm dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Grafik spektrofotometer konsentrasi total RNA

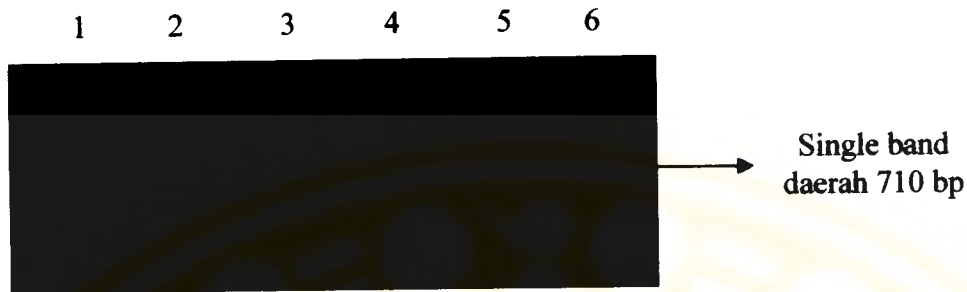
Keterangan gambar : sampel 1 : dosis $1/12$ LD₅₀; sampel 2 : dosis $1/17$ LD₅₀; sampel 3 : dosis $1/90$ LD₅₀; sampel 4 : dosis $1/100$ LD₅₀; sampel 5 : kontrol (+); sampel 6 : kontrol (-); blanko : aquadest. Absorbansi yang digunakan diambil pada λ maks 260 nm.

Dari grafik pada Gambar 5.2 dapat dilihat bahwa puncak absorban tertinggi didapatkan pada panjang gelombang (λ maks) 260 nm, hal ini dikarenakan pada RNA berpondar pada λ maks 260 nm. Sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi total RNA yang didapatkan bisa memenuhi konsentrasi total RNA yang dibutuhkan untuk northern blot yaitu sebanyak minimal 10 μ g.

5.4 Hasil Northern Blot

Setelah diketahui konsentrasi total RNA yang akan digunakan, maka total RNA tersebut dirunning dengan loading dye formaldehyde dan formamide dan dilakukan serangkaian tahapan Northern blot sesuai dengan Sambrook *et.al* (1989) serta proses pelabelan probe dan proses imunodeteksi sesuai *Dig High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II*. Pada penelitian ini konsentrasi total RNA yang digunakan adalah sebesar 20 μ g.

Hasil dari proses northern blot tersebut akan ditransfer ke film dan menghasilkan gambar seperti yang terdapat pada Gambar 5.3



Gambar 5.3 Hasil Hibridisasi Northern Blot

Keterangan gambar : jalur 1: dosis $1/12$ LD₅₀, jalur 2: dosis $1/17$ LD₅₀, jalur 3: dosis $1/90$ LD₅₀, jalur 4 : dosis $1/100$ LD₅₀, jalur 5: kontrol (+), jalur 6: kontrol (-). Hibridisasi yang dilakukan menggunakan probe cDNA dengan panjang 710 bp.

Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada nomor 1,2,3,4 dan 6 yaitu total RNA mencit perlakuan dari dosis $1/12$ LD₅₀, $1/17$ LD₅₀, $1/90$ LD₅₀, $1/100$ LD₅₀ dan kontrol (-) terdapat pita tunggal (*single band*) sementara pada nomor 5 yaitu kontrol (+) tidak nampak adanya pita tunggal. Hibridisasi northern blot pada penelitian ini digunakan probe dengan panjang nukleotida 710 bp (Utami, 2005) yang telah dilabel dengan *DIG High Prime*.

BAB VI

PEMBAHASAN

Justicia gendarussa Burm.f sebagai salah satu obat kontrasepsi pria diperlukan adanya suatu analisis untuk menjamin bahwa gendarusa tersebut aman digunakan. Salah satunya adalah untuk mengetahui adanya perubahan atau tidak pada tingkat rangkaian RNA setelah pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f ini.

Pada penelitian ini digunakan total RNA testis mencit sebagai bahan analisis karena pada testis terdapat tubulus seminiferus yang mensekresi spermatozoa (Nalbandov, 1990). Sedangkan untuk metode analisisnya digunakan metode hibridisasi northern blot dimana teknik northern blot adalah teknik yang paling mendasar dan berdaya guna serta merupakan suatu metode kuantitatif, sensitif dan dapat diandalkan (Wu *et.al.*, 1997).

Fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f yang digunakan dalam penelitian ini diambil dalam empat dosis yaitu $1/12$ LD₅₀ (26,06mg), $1/17$ LD₅₀ (18,39mg), $1/90$ LD₅₀ (3,47mg), $1/100$ LD₅₀ (3,13 mg), selain itu digunakan juga CMC-Na 0,5% sebagai kontrol (-) dan hesperidin 0,2% sebagai kontrol (+). Dipilihnya empat dosis tersebut disebabkan karena menurut penelitian IVF (In Vitro Fertilitation) yang telah dilakukan sebelumnya didapatkan data bahwa pada keempat dosis diatas tidak menimbulkan terjadinya fertilisasi pada ovum mencit yang dibuahi oleh sperma mencit yang telah diberi perlakuan.

Hal pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pengisolasian total RNA dari testis mencit. Isolasi total RNA dilakukan dengan metode Trizol™ sebab merupakan metode yang efektif untuk denaturasi sel dan sangat baik untuk menahan aktivitas RNase sehingga akan didapat kadar yang banyak dan didapatkan hasil kemurnian yang besar (Simms *et.al.*,1991). Untuk melihat apakah isolasi total RNA yang telah dilakukan menghasilkan total RNA maka total RNA tersebut diperiksa menggunakan elektroforesis dan hasilnya terlihat bahwa terdapat total RNA pada gel agarose yang telah *dirunning*. Setelah dilakukan elektroforesis maka total RNA yang didapatkan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer UV dengan λ maks 260 nm. Dari hasil

pengukuran didapatkan konsentrasi total RNA sampel 1 ($1/12$ LD₅₀) sebesar 7,76 µg/µl, sampel 2 ($1/17$ LD₅₀) 7,00 µg/µl, sampel 3 ($1/90$ LD₅₀) 21,20 µg/µl, sampel 4 ($1/100$ LD₅₀) 37,64 µg/µl, kontrol (+) 47,00 µg/µl dan kontrol (-) 28,52 µg/µl. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi total RNA yang didapat cukup besar dan dapat digunakan dalam proses hibridisasi northern blot. Suatu spesies RNA hadir satu kali dalam sel dapat dideteksi dengan me"loading" kurang lebih 60 µg total RNA, kemudian mRNA yang muncul pada level 5 sampai 10 kopi atau lebih per sel biasanya dapat dideteksi dengan me"loading" 10 µg total RNA (Davis *et.al.*,1994). Dari pernyataan tersebut dapat dikatakan bahwa total RNA yang didapat mencukupi untuk digunakan dalam hibridisasi northern blot.

Selanjutnya dilakukan serangkaian proses hibridisasi northern blot menggunakan probe dengan panjang nukleotida 710 bp yang telah dilabel menggunakan *DIG High Prime*. Pada hasil film negatif didapatkan data bahwa sampel 1 ($1/12$ LD₅₀), 2 ($1/17$ LD₅₀), 3 ($1/90$ LD₅₀), 4 ($1/100$ LD₅₀) dan 6 (kontrol (-)) menunjukkan adanya pita tunggal (*single band*) namun pada sampel 5 (kontrol (+)) tidak nampak adanya pita/*band*. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa probe yang digunakan telah terhibridisasi dengan baik dengan total RNA yang digunakan serta dapat pula dikatakan bahwa tidak ada perubahan rangkaian RNA pada kelima sampel tersebut.

Pada Gambar 5.3 dapat dilihat bahwa pita pada sampel 1 dan 2 terlihat tipis dibandingkan dengan pita sampel kontrol negatif (sampel 6) sedangkan pita sampel 3 dan 4 mempunyai ketebalan yang hampir sama dengan sampel 6, hal ini menunjukkan bahwa sampel 3 dan 4 telah terekspresi lebih sempurna dibandingkan sampel 1 dan 2. Sedangkan untuk kontrol (+), dimana mengandung hesperidin 0,2%, tidak didapatkan adanya pita/*band*, hal tersebut kemungkinan dapat disebabkan karena kelebihan garam pada total RNA sampel sehingga pitanya berjalan cepat dan menjadi habis setelah proses *running* selesai atau karena adanya kontaminasi RNAse (Davis *et.al.*,1994). Dapat pula disebabkan karena adanya mutasi pada rangkaian basa nukleotida testis mencit setelah pemberian hesperidin sehingga tidak terjadi hibridisasi antara probe dengan RNanya. Tidak adanya literatur yang mendukung bahwa hesperidin dapat mengakibatkan mutasi menyebabkan diperlukannya suatu pemeriksaan rangkaian

basa nukleotida lebih lanjut dari testis kontrol (+) melalui sequencing untuk mengetahui apakah memang terjadi perubahan rangkaian RNA sehingga tidak dapat cocok dengan probe yang digunakan atau karena kesalahan preparasi saja. Sehingga dapat diketahui sampai sejauh mana hesperidin aman digunakan.

Penelitian ini dilakukan selama kurang lebih satu tahun dengan tingkat kegagalan yang tinggi. Penyebab dari kegagalan tersebut salah satunya disebabkan karena perlunya optimasi dan validasi dari metode dan alat-alat yang digunakan. Hal ini diperlukan karena RNA sangat rentan terjadi degradasi, sehingga adanya kontaminasi sedikit saja mengakibatkan rusaknya RNA yang didapat dan konsentrasinya akan menurun. Penurunan konsentrasi ini berakibat pada pengujian RNA sampel dengan menggunakan northern blot sehingga pita yang diharapkan tidak dapat terbentuk.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f dengan 4 macam dosis ($1/12$ LD₅₀; $1/17$ LD₅₀; $1/90$ LD₅₀ dan $1/100$ LD₅₀) dan kontrol (-) tidak menyebabkan terjadinya perubahan rangkaian RNA pada testis mencit.

SARAN

Tidak terjadinya perubahan pada RNA testis mencit setelah pemberian fraksi air *Justicia gendarussa* Burm.f berdasarkan uji northern blot perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat apakah benar-benar tidak ada mutasi RNA atau jenis mutasi seperti *point mutation*, substitusi, yang tidak dapat diperlihatkan oleh northern blot.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. *Materia Medika Jilid IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal.33.
- Anonim.2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*,Cetakan Pertama.Departemen Kesehatan RI,Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan.Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. Hal.10-12.
- Bruce A, B Dennis., L Julian, R Martin, R Keith., JD Watson. 1994. *Cell Molecular Biology 2nd Edition* (Terjemahan). Jakarta : PT.Gramedia Pustaka Utama. Hal 302-304.
- Buchanan BB, Grussem W, Jonen RL. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. Maryland: America Society of Plant Physiology. P.295
- Constantia E.1992.*Pengaruh Infus Daun Justicia gendarusa Burm.f Terhadap Kadar Testosteron Dalam Serum Rattus Norvegicus*. **Skripsi**.Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Freifelder D, Malacinski GM. 1993. *Essential of Molecular Biology*, 2nd Edition. Boston: Jones and Bartlet Publishers. P.209-226.
- Heyne K.1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid III*.Terjemahan.Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya. Hal.1759.
- Ilham W.1992.*Pengaruh Infus Daun Justicia gendarusa Burm.f Terhadap Efek Antifertilitas Spermatogenesis Mencit*.**Skripsi**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Kimball JW. 2004. *Biology : Nucleotide, The Double Helix, Base Pairing, The Genetic Code, Gene Expression : Transcription*.
[Http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages)
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2001. *Molecular Cell Biology 4th Ed*.New York: W.H.Freeman and Company. P.87.
- Moeso S, Agus P.1985. *Laporan Perjalanan Ke Jayapura Sentani (Irian Jaya)*.Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Hal.19.

- Mulya M, Syahrani A. 1990. *Aplikasi Analisis Spektrofotometri UV-Vis*. Surabaya: Mephiso Gravika. Hal.2-3,13
- Nalbandov AV. 1990. *Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia dan Unggas* Ed.3.Jakarta: Universitas Indonesia. Hal.42.
- Prajogo BEW. 2002. *Aktivitas Antifertilitas Flavonoid Daun Justicia gendarusa Burm.f*.**Disertasi**.Surabaya: Universitas Airlangga.
- Sambrook J, EF Fritsch., T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simms D, Cizdziel P, Chomczynsky P. 1991. *TrizolTM: A New Reagent For Optimal Single-Step Isolation Of RNA*. The Giblacko BRL. P.99-103.
- Suckristiana, ES. 1998. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Diklorometana dan Etanol Daun Gendarusa vulgaris Nees terhadap Fungsi Epididimis Kelinci*.**Skripsi**.Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Turner MCP c Lennan AG, Bates AD, White MRH. 2000. *Instant Notes Molecular Biology* 2nd Ed. Bios Scientific Publishers Limited. P.43-44
- Utami SL. 2005. *Pengaruh Fraksi Air Gandarusa (J.gendarussa Burm.f) Terhadap Ekspresi Gen Hyaluronidase Testis Mencit (Mus Musculus L.) Dengan Analisis PCR*. **Tesis**. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga
- Van Stenis CGGJ. 1978.*Flora : Untuk Sekolah di Indonesia*.Jakarta: PT Pradnya Paramita. Hal 393-414.
- Wu W, MJ Welsh, P Kaufmand, HH Zhang.1997.*Methods in Gene Biotechnology*.CRC Press LLC. P.153-258.

Lampiran-1

Komposisi bahan-bahan dan buffer :

1. Washing buffer (buffer dari Dig High Prime DNA Labelling)
Dibuat dengan komposisi 0,1 M asam maleat (3,48g), 0,15 M NaCl pH 7,5 (45 ml), 0,3% v/v tween 20 (0,9 ml) dan ditambahkan aquadest hingga 300 ml.
2. Buffer TE (pH 7,6)
Mengandung 10 mM Tris-Cl pH7,6 (0,6 ml) dan 1mM EDTA pH 8 (0,15 ml) kemudian ditambah aquadest sedikit dan diadjust pHnya hingga 7,6 lalu ditambah kembali aquadest hingga 30 ml.
3. Pembuatan 220 ml gel agarose 1,2%
Mengandung 2,64 g agarose; 158,4 ml aquabidest dan 22 ml buffer 10x MOPS.
4. Buffer 10x MOPS
20,9 g MOPS + 125 ml aquabidest + 3 ml 0,5M EDTA (pH 8) + 4,17 ml 3M Na asetat dan diadjust pHnya hingga 7, kemudian ditambahkan aquadest hingga 250 ml.
5. Stringency wash I
Mengandung 0,1 % SDS (1ml) dan ditambahkan 2x SSC hingga 200 ml.
6. Stringency wash II
Mengandung 0,1% SDS (1 ml) yang dicampur dengan 0,5x SSC hingga 200 ml.
7. Loading dye northern blot.
Mengandung 6% 10x buffer MOPS, 18% formaldehid, 60% formamide, 16% loading dye RNA
8. Detection buffer
Dibuat dari 0,1 M Tris-Cl (10 ml) dan 0,1 M NaCl (5 ml) kemudian diadjust pHnya hingga 9,5 dan ditambahkan aquadest hingga 50 ml.
9. Blocking solution
10 ml 10x blocking solution dilarutkan dalam buffer asam maleat hingga 100 ml (1:10).

10. Antibody solution

Mengandung anti digoxigenin-AP 2 μ l, yang sebelumnya disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, kemudian dilarutkan kedalam blocking solution hingga 20 ml.

Lampiran-2

Perhitungan konsentrasi total RNA testis mencit dengan spektrofotometer UV pada λ maks 260nm dapat dihitung sebagai berikut :

$X = (\text{nilai absorbansi sampel pada } \lambda \text{ maks 260nm} - \text{nilai absorbansi blangko pada } \lambda \text{ maks 260nm}) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

1. Untuk sampel 1 ($1/12 \text{ LD}_{50}$) : $(0,333-0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 7,76 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $7,76 \times 15 = 116,40 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$
2. Untuk sampel 2 ($1/17 \text{ LD}_{50}$) : $(0,314-0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 7,00 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $7,00 \times 15 = 105,00 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$
3. Untuk sampel 3 ($1/90 \text{ LD}_{50}$) : $(0,669-0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 21,20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $21,20 \times 15 = 318,00 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$
4. Untuk sampel 4 ($1/100 \text{ LD}_{50}$) : $(1,080-0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 37,64 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $37,64 \times 15 = 564,60 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$
5. Untuk sampel 5 (control (+)) : $(1,314-0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 47,00 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $47,00 \times 15 = 705,00 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$
6. Untuk sampel 6 (control (-)) : $(0,852 - 0,139) \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 28,52 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
 Dalam 15 μl : $28,52 \times 15 = 427,80 \mu\text{g}/15 \mu\text{l}$

Lampiran-3

Hasil pengukuran Spektrofotometer UV-Vis RNA sampel dan blangko.

1. Blangko : aquadest steril

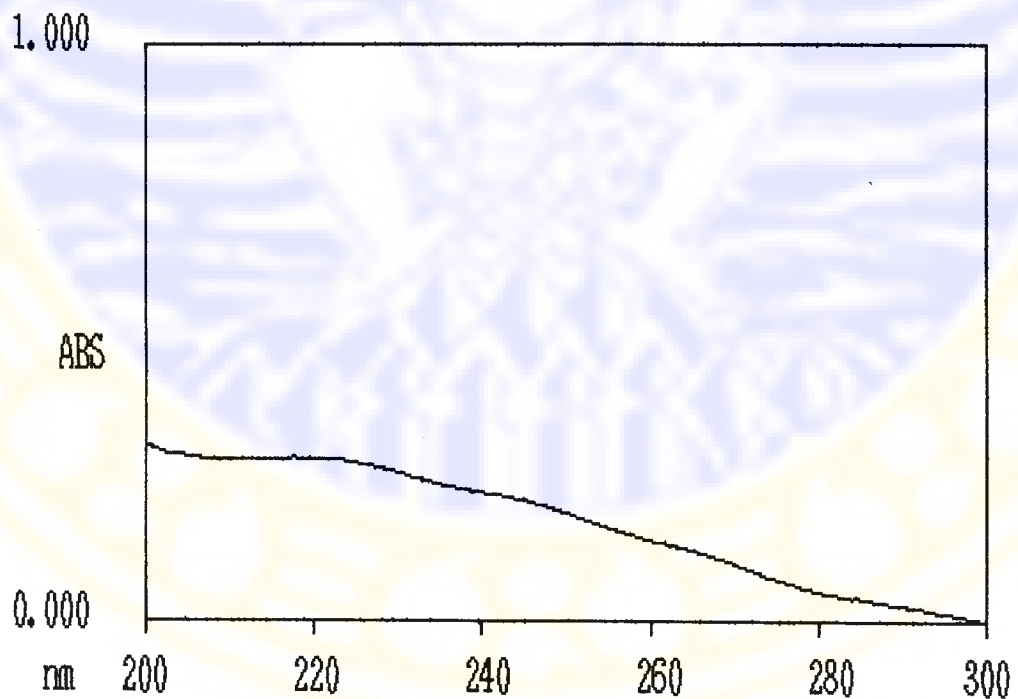
WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:51

nm	ABS
300.0	0.000
290.0	0.027
280.0	0.052
270.0	0.098
260.0	0.139
250.0	0.185
240.0	0.221
230.0	0.256
220.0	0.281
210.0	0.278
200.0	0.302

WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:52



2. Sampel RNA 1 (dosis $1/12$ LD₅₀)

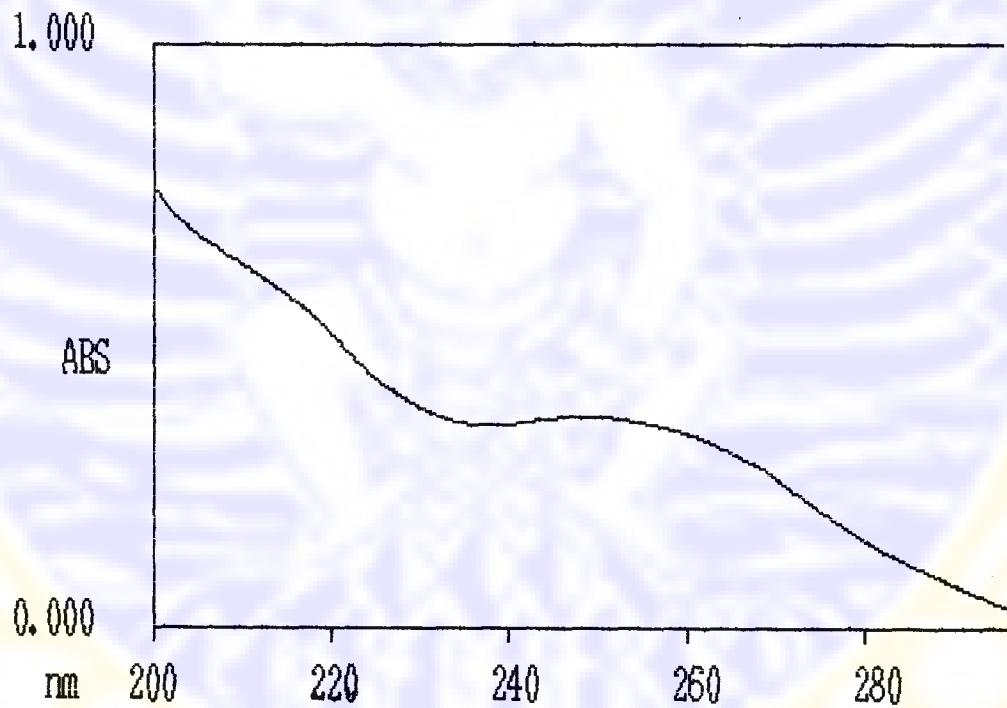
WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:55

nm	ABS
300.0	0.015
290.0	0.075
280.0	0.150
270.0	0.257
260.0	0.333
250.0	0.363
240.0	0.350
230.0	0.377
220.0	0.503
210.0	0.621
200.0	0.751

WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:56



3. Sampel RNA 2 (dosis $1/17$ LD₅₀)

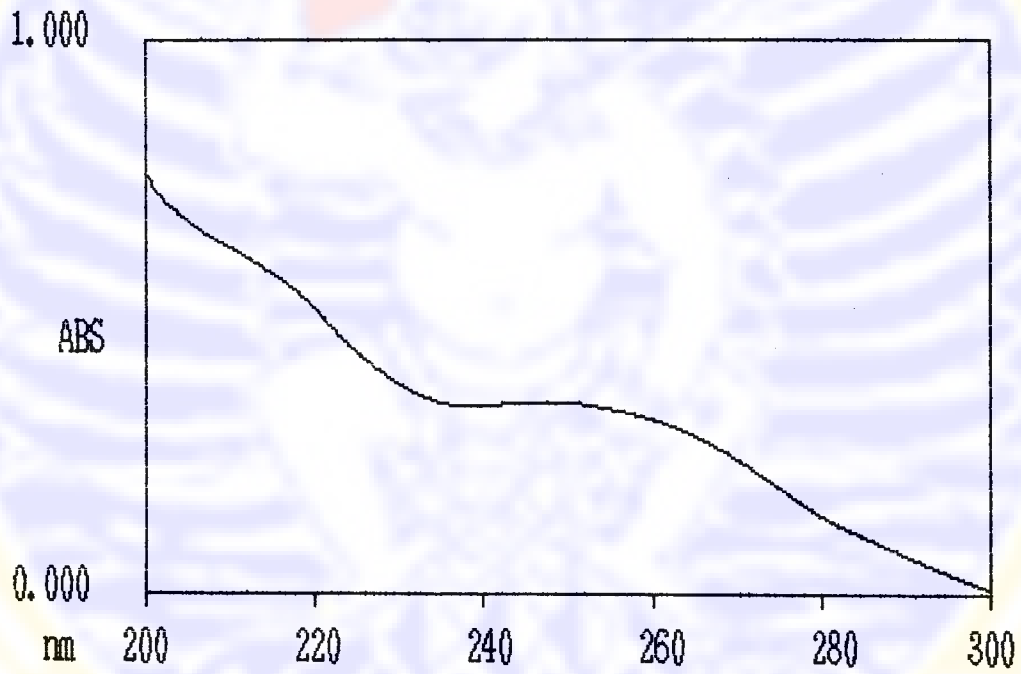
WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:58

nm	ABS
300.0	0.011
290.0	0.068
280.0	0.140
270.0	0.242
260.0	0.314
250.0	0.345
240.0	0.339
230.0	0.378
220.0	0.514
210.0	0.623
200.0	0.755

WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 10:58



4. Sampel RNA 3 (dosis $1/90$ LD₅₀)

WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 11:00

nm	ABS
300.0	0.083
290.0	0.169
280.0	0.321
270.0	0.538
260.0	0.669
250.0	0.661
240.0	0.565
230.0	0.611
220.0	0.991
210.0	1.359
200.0	1.699

WAVELENGTH SCAN/TPT

28/06/05 11:01

